



“Un subgrupo de isoformas de los receptores de lipoforinas de *Drosophila melanogaster* interacciona con distintas afinidades con las lipoproteínas lipoforina y LTP en la membrana plasmática, mediando así la adquisición celular de lípidos neutros”



TESIS DOCTORAL

Miriam Rodríguez Vázquez
Sevilla, 2018



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DOCTORADO EN BIOLOGÍA INTEGRADA:
Biología Molecular y Celular, Microbiología: Fisiología,
Biotecnología y Biodiversidad

**“Un subgrupo de isoformas de
los receptores de lipoforinas de
Drosophila melanogaster interacciona
con distintas afinidades con las
lipoproteínas lipoforina y LTP en la
membrana plasmática, mediando así la
adquisición celular de
lípidos neutros”**

TESIS DOCTORAL

Director de Tesis: Joaquim Culi Espigul

Miriam Rodríguez Vázquez
Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD)
Sevilla, 2018

Pensaba que esta parte sería la más fácil de escribir, sin embargo, muchos sentimientos se acumulan al recordar todo el camino recorrido para llegar a este momento.

En primer lugar, quiero agradecer enormemente a **Joaquim Culi**, por darme la oportunidad de trabajar a su lado e impregnarme de parte de su enorme sabiduría. Agradezco la confianza que has depositado en mí desde el primer momento y la infinita paciencia que has tenido conmigo en este largo camino. No podría haber tenido mejor maestro de orquesta, y aunque desafinara algunas veces, siempre me has guiado para que me superase día a día. No sólo me has enseñado protocolos de laboratorio (sin olvidar los controles), me has enseñado algo mucho más importante que es pensar y desarrollar las ideas como un científico.

No puedo hablar de Quim sin nombrar al laboratorio 142, aquel en el que entré años atrás y donde me acogieron como una más de la familia. Esmeralda, me enseñó la rigurosidad y su siempre disponibilidad para debatir cualquier asunto científico. David, gran amigo y apoyo en estos años. Gracias “chico” por ayudarme en todo momento y sacarme siempre una sonrisa. Y John, ¿Qué hubiera sido de mí sin ti? Mucho de lo que sé te lo debo a ti. Me acogiste en tu poyata en mis primeros pasos en el mundo de la Biología molecular y tuviste una paciencia de oro. El pequeñín del lugar me ha enseñado grandes cosas, destacando el significado de “GP: Guinea Pig”. A todos vosotros muchas gracias por hacer que mi día a día fuera más ameno, y no sólo compartir pipetas sino risas y buenos momentos que jamás olvidaré.

Pasamos al laboratorio 143 o comúnmente denominado “el laboratorio de los vecinos”. Primero quiero agradecer a James Castelli y Sol Sotillos por sus consejos y su ayuda en todo momento. Muchas personas han pasado a lo largo de estos años y todas han aportado algo positivo. Gracias a cada una de ellas: Marisa, Patri, Silvia, Mari Carmen, Pako, Pedro, Carlos, José y Sara. Tengo que destacar a Mario y Calero. No me puedo imaginar mi tesis sin vosotros como co-protagonistas. El final del día visitando a “los vecinos” para contar lo que ha acontecido durante el día. Carcajadas infinitas y confesiones desastrosas. Mario, has sido un ejemplo de superación y tus consejos me han servido para avanzar y ser más exigente conmigo misma. Además de un compañero, me llevé un gran amigo. Calero, mi Lero, ¿Qué te puedo decir que no sepas? Has sido para mí un pilar fundamental en todo este tiempo. No existen palabras de agradecimiento para expresar lo mucho que me has ayudado y apoyado en los momentos más difíciles. Gracias también por tu amistad, los numerosos viajes y momentos del que me has hecho partícipe. Quedarán por siempre en mi retina.

Un poco más hacia delante se encuentra el laboratorio de Casares (sin número). Gracias a Mari Ángeles, Antonella, Marta Magri, Jorge y mis niñas Diana y Martinha. No puedo salir de este laboratorio sin antes dedicar unas líneas a Marta, mi *portuguesinha*. Mi gratitud hacia ti es infinita. Siempre has estado ahí cuando te he necesitado, echándome una mano en cualquier ámbito: Escuchando mi inglés en los ensayos de los seminarios más importantes o en el coche intentando entonar las canciones más dispares. *Muito obrigada minha amiga*.

Entre los moscólogos, agradecer a Lola y Acaimo, por su generosidad y sus aportaciones en los seminarios, ampliando mis perspectivas en el ámbito de *Drosophila*. También a: Mari Carmen, Alicia, Clara, Juanjo, Beatriz, María, Andrea, Alfonsa y Besaid; por sus risas y sus charlas tan amenas.

Gracias a la gente de gusanos: Blanca, Celia, Gina, Artur y Carlos Viso. De peces: María Nicolás, Ana Ariza, Inés, Nacho y Carlos. A los “Damianes”: Franz, Juan Carlos, David, Ibai, Ricardo y Timothée. Proteómica: Laura Tomás. Y en general, dar las gracias a toda la gente del CABD. Todos ellos han formado parte de mi vida diaria y siempre me han sacado una sonrisa.

Tengo que agradecer especialmente a mi gente del “Coffee-time”, Mariam, Sofi, Helenita, Elena, Ana, David, Kathy, José, Juan, Calero y Mario. Jamás olvidaré aquellas charlas que nos evadían por unos momentos del laboratorio, las risas y los buenos ratos concentrados en unos sofás donde cada uno tenía su sitio bien establecido. Lo importante ha sido que después hemos podido pasar más e incluso mejores momentos fuera, con recuerdos que permanecerán guardados siempre en la memoria: Mi primera feria, la ruta de la Alfalfa, esos serranitos de pollo del Trini, Donaldzon, y demás. Es bonito saber que además de una tesis, te llevas a amigos de verdad.

Gracias a mis amigos de la facultad: Carmen Mari, Rosa, Amalia, Alejandra, Patri, Ana Mari, Laura, Antonio, David, Ana y Juanma, por hacer que la tesis sea más llevadera. Mis compis Susana y Lolet, porque ¡no sé qué haría sin vosotras chicas! Y mis amigos: Isa, Carmencita, María José, Eres, Virginia, Angy, mis Cartayeras, Raúl, Asier y Azu, compartir el tiempo y la vida con vosotros ha sido el mejor regalo.

No puedo dar por terminado los agradecimientos sin agradecer a **mi familia**. Gracias a mis abuelos, tíos y primos, por animarme y ser feliz. Me siento agradecida por tener una familia tan unida. Gracias a mis padres por todo lo que han hecho por mí. Por su confianza, por creer en mí antes de que yo lo hiciera. Por empujarme hacia la persona que soy hoy día. Por enseñarme los verdaderos valores de la vida, de querer siempre mejorar y alcanzar mis metas. De que la palabra imposible no existe. Gracias por hacerme una persona independiente, que cometiera mis propios errores y que aprendiera de ellos. No puedo pedir mejores guías de la vida, con ellos sé que jamás viajaré sola. Por todo esto y por vuestro respaldo incondicional, os quiero.

Antes de acabar, me gustaría compartir el resumen que realiza mi abuela Carmen de lo que ha supuesto mi tesis:

“Mi nieta ¹San-Miriam, es Bionosequé (pausa mientras piensa qué es nosequé). Vamos, que se dedica a matar moscas en el laboratorio”

¹San., no procede del apócope de Santa, sino del nombre de mi prima Sandra.

ÍNDICE

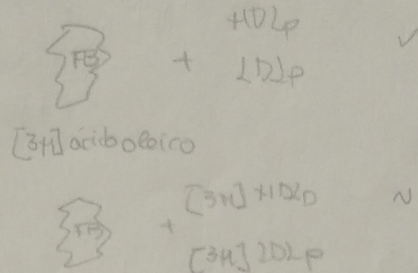
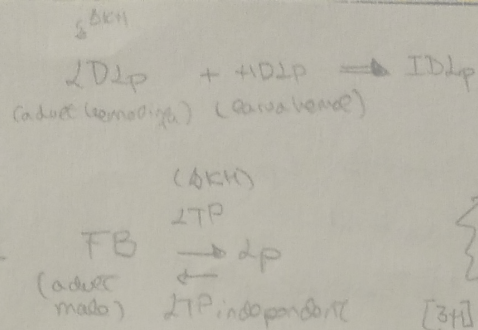
RESUMEN/SUMMARY	13
ABREVIATURAS	19
INTRODUCCIÓN	25
1. Síndrome metabólico y su relevancia	27
2. <i>Drosophila</i> como organismo modelo para el estudio del metabolismo lipídico.....	27
3. Familia de los receptores LDLR.....	30
4. Caracterización de los dominios de interacción entre miembros de la familia LDLR y sus ligandos.....	33
5. Comparación del transporte de lípidos en mamíferos e insectos.....	36
5.1. Metabolismo lipídico: Las lipoproteínas.....	36
5.2. Metabolismo de los <u>TAG</u> en mamíferos (quilomicrones, remanentes de quilomicrones y VLDL).....	37
Metabolismo de las lipoproteínas ricas en TAG.....	38
5.3. Metabolismo del <u>colesterol</u> en mamíferos y proteínas de transferencia de lípidos (CETP) y fosfolípidos (PLTP).....	40
5.4. Metabolismo lipídico en insectos	42
Lipoforina.....	42
LTP (<i>Lipid Transfer Particle</i>).....	45
Receptores de lipoforinas.....	51
6. Estructura de los péptidos señal y sus funciones.....	55
OBJETIVOS	59
MATERIALES Y MÉTODOS	63
1. GENÉTICA.....	65
1.1. Sistema <i>UAS/Gal4/Gal80^{ts}</i>	65

1.2. Cepas de <i>Drosophila</i>	66
1.3. Inhibición de la endocitosis: <i>shi^{ts}</i>	68
1.4. Generación de clones de falta de función	68
2. INMUNOHISTOQUÍMICA	69
2.1. PROTOCOLO ESTÁNDAR: Inmunotinción de discos de alas, ovarios, glándulas salivales y cuerpo graso.....	69
2.2. Tinción extracelular.....	70
2.3. Inmunotinción en células S2 de <i>Drosophila melanogaster</i>	70
3. CULTIVOS CELULARES	71
3.1. Transfección de células S2	71
4. BIOQUÍMICA	73
4.1. Ensayo de Co-InmunoPrecipitación (Co-IP).....	73
4.2. Procesamiento del dominio intracelular.....	76
4.3. Estudio temporal de la expresión de los receptores de lipoforinas en discos imaginales de ala	76
5. BIOLOGÍA MOLECULAR	77
5.1. Construcción de transgenes.....	77
6. TAMPONES	82
7. TABLAS	83
7.1. Anticuerpos.....	83
7.2. Cebadores	84
7.3. ADNc.....	85
RESULTADOS	87
1. Efecto de los distintos dominios proteicos de los receptores de lipoforinas sobre su distribución subcelular en discos imaginales	89
1.1. Estudio con marcadores de compartimentos subcelulares	91
1.2. Estudio de los dominios proteicos implicados en la distribución subcelular diferencial entre las distintas isoformas de los receptores de lipoforinas.....	94

1.3. Fusión de un epítipo extracelular a distintas isoformas de los receptores de lipoforinas.....	98
1.4. Los altos niveles de expresión de Lpr2F inducen apoptosis.....	102
1.5. Función de los péptidos señal de las isoformas de los receptores de lipoforinas	106
Regulación de la actividad del péptido señal largo.....	111
2. Interacción de los receptores de lipoforinas con sus ligandos.....	113
2.1. Interacción de los receptores de lipoforinas con su ligando clásico: La lipoforina.....	114
a) Interacción de los receptores de lipoforinas con la lipoforina.....	114
b) Efecto de la expresión de los receptores de lipoforinas sobre la endocitosis de lipoforina.....	120
2.2. Interacción de los receptores de lipoforinas con la lipoproteína <i>Lipid Transfer Particle</i> (LTP).....	123
a) Lpr2E promueve la acumulación extracelular de LTP en la membrana basolateral así como su endocitosis.....	124
b) Los receptores de lipoforinas se requieren para la acumulación de LTP en las membranas plasmáticas de ovarios y discos imaginales en animales silvestres.....	125
c) La toma de lípidos en discos imaginales de ala y ovarios requiere que el LTP se acumule en la membrana plasmática.....	125
d) Mapeo de los dominios de interacción de Lpr2E con el LTP	127
Comparación del dominio LA1 entre especies.....	131
e) La interacción de la isoforma Lr2E con su ligando LTP se requiere para la estabilización de la lipoforina.....	131
f) Conservación de la función de los receptores LDLR.....	134
2.3. Posible interacción de los receptores de lipoforinas con un ligando no relacionado con el metabolismo lipídico: La Peroxidasina (Pxn).....	137
DISCUSIÓN.....	141
1. Los distintos péptidos señal presentes en las isoformas de los receptores de lipoforinas determinan los niveles de expresión de la proteína.....	143
2. La lipoforina se une débilmente a los receptores de lipoforinas.....	146

3. Los receptores de lipoforinas endocitan la lipoforina independientemente de la toma de lípidos.....	148
4. La lipoproteína LTP es indispensable para la adquisición de lípidos en tejidos periféricos. Mecanismo de acción.....	150
Comparación del dominio LA1 entre especies.....	154
CONCLUSIONES.....	155
BIBLIOGRAFÍA.....	159
ANEXOS.....	181
I. Publicación Rodríguez-Vázquez <i>et al.</i> , 2015.....	183
II. Análisis de los péptidos señal de los receptores de lipoforinas.....	207

- 1986 Ryan et al
- 1986 "
- 1988 "
- 1989 von Heesdonck et al



Hay T&G marcado en el cuerpo graso pero no depende de LTP.

- 1990 Ryan et al

- LDL + HDL : - Presencia LTP
- LDL : - Ausencia LTP
- SH-DGG + HDL : - Presencia LTP
- LDL : - Ausencia LTP
- HDLP : - Presencia LTP
- 3H-CC-LDL : - Ausencia LTP
- HDLP : - Presencia LTP
- 3H-DGG-LDL : - Ausencia LTP

RESUMEN SUMMARY

- 1990 Ryan et al

- LDL + Xp LTP

- LDL + [3H] LTP

- Microscopia electronica

HDLP (18nm) LDL (26nm)

LDL + LTP → HDLP (18nm) VLDLP (33nm)

[25I]-apoB-100-LDL - Presencia LTP

- 1990 Hirayama and Chino

- [3H] Lipids-LDL + HDLP

Acid phosphatase

No hay TRANSFERENCIA NETO, ya que no se forma ningún intermediario.

LDL HDLP

[3H] Lipids-HDL + LDL - Presencia LTP

LTP (122 mg/ml). Contenido 600kDa

apoBPI 1

El estilo de vida sedentario sumado a nuevos hábitos de alimentación están generando a nivel mundial un incesante aumento de enfermedades relacionadas con el metabolismo lipídico y sus complicaciones, como por ejemplo la aterosclerosis.

En mamíferos, tanto la adquisición celular de lípidos como su metabolismo están ampliamente estudiados, siendo los receptores de lipoproteínas de baja densidad o LDLR un componente fundamental para su regulación. En *Drosophila*, a pesar de ser un organismo modelo muy utilizado para afecciones derivadas del síndrome metabólico como la obesidad, se desconocen aspectos básicos de su metabolismo lipídico. En esta tesis, hemos esclarecido el mecanismo mediante el cual se transfieren los lípidos desde las lipoproteínas circulantes hasta tejidos periféricos como los discos imaginales y ovarios.

La lipoforina es la lipoproteína mayoritaria en la hemolinfa y su interacción con distintos tejidos está mediada por los receptores de lipoforinas, homólogos al LDLR. Sin embargo, hemos demostrado que dicha interacción es principalmente indirecta y transitoria. Además de la lipoforina, en la hemolinfa hay otra lipoproteína circulante, aunque minoritaria, capaz de catalizar la transferencia de lípidos entre lipoproteínas y tejidos, denominada LTP. En esta tesis hemos demostrado que el reclutamiento del LTP por parte de los receptores de lipoforinas es el evento inicial que desencadena la adquisición de lípidos por las células. Esta interacción, de tipo fuerte, se produce únicamente con las isoformas de los receptores de lipoforinas que contienen el dominio LA1, y se incrementa por la presencia de 16 aminoácidos adyacentes, altamente conservados. Esta unión, a su vez, promueve la estabilización extracelular de la lipoforina en las membranas plasmáticas. Estos tres elementos: receptores de lipoforinas, LTP y lipoforinas, forman un intermediario funcional durante la transferencia de lípidos desde la lipoforina a la célula en un proceso que es independiente de su endocitosis. Además, hemos demostrado que las isoformas de los receptores de lipoforinas que median la toma de lípidos contienen un péptido señal atípicamente largo que lleva a unos menores niveles de traducción de estas isoformas. Desconocemos la repercusión funcional de esta menor traducción.

Nuestros datos aclaran un aspecto central del metabolismo de lípidos en *Drosophila*. Mostramos que los receptores de lipoforinas tienen una función relacionada con la de los LDLR de mamíferos pero que, a pesar de su similitud, tienen un mecanismo de acción distinto. Ello evidencia aún más la versatilidad de la familia de los receptores LDLR a lo largo de la evolución y de las distintas especies.

Sedentary lifestyle and new dietary habits are causing a worldwide increase in diseases and conditions related to an unbalanced lipid metabolism, such as atherosclerosis.

The core elements of mammalian lipid metabolism and cellular lipid uptake are well understood. One of the key components is the Low Density Lipoprotein Receptors (LDLR), which regulate cholesterol homeostasis.

Because of its genetics, *Drosophila* is becoming a widely used model organism to study disorders associated to metabolic syndrome, such as obesity. However, there are still basic aspects of *Drosophila* lipid metabolism that we do not understand, hindering its value as a valid model. In this thesis, we uncovered the molecular mechanism that mediates the transfer of lipids from circulating lipoproteins to peripheral tissues like imaginal discs and ovaries in *Drosophila*.

Lipophorin is the major lipid carrier in hemolymph. It interacts with tissues through the lipophorin receptors, homologous to the human LDLR. However, we have demonstrated that this interaction is mostly indirect and transient. In addition to lipophorin, hemolymph also contains the lipoprotein Lipid Transfer Particle (LTP), with the catalytic activity of transferring lipids between lipoproteins and membranes. Here, we show that the lipophorin receptors recruit LTP to the plasma membrane and that this is the key event that triggers the uptake of neutral lipids into cells. This high affinity binding between LTP and the lipophorin receptors requires the LA1 domain, found in a subset of lipophorin receptor isoforms, and is strengthened by a contiguous region of 16 conserved amino acids. This interaction also promotes the extracellular stabilization of lipophorin in the plasma membranes. These three elements: Lipophorin receptors, LTP and lipophorin, represent a functional intermediate during lipid transfer from lipophorin to cells, a process that does not require the endocytosis of the complex. We also show that the lipophorin receptor isoforms that mediated lipid uptake contain an atypically long signal peptide that induces low levels of translation. We do not know the functional implications of this.

Together, our data improves our understanding of a central aspect of lipid metabolism in *Drosophila*. Interestingly, even though the lipophorin receptors and the human LDLR have related functions and structure, the specific molecular mechanisms involved are diverse. This is a clear example of LDLR family versatility throughout evolution and in different species.

- Dsim
no orth.

GD18173

B4QVEO

68 aa

TA^bTP

0.9414

- Dsec.
no orth.

GM10222

B4ICD2

68 aa

TA^bTP

0.9414

D32738

- Dyak
no orth.

GC10520

79 aa

TA^bTP

0.9414

ABREVIATURAS

- Dere
Apr1

GG12223

72 aa

TA^bTP B3PGF8

0.9414

- Dama
Apr1

GF18234

79 aa

TA^bTP B3LYM8

0.9400

- Dmoj
Apr1

GI10346

71 aa

TA^bTP B4K4U9

0.8758

- Dpse
Apr1

GA27443

75 aa

iso-B TA^bTP

0.9708

B5D7P2

iso-B

isoE I54P69

- Dvir
Apr2

GS10197

80 aa

TA^bTP B4M4P2

0.8532

- Dwil
Apr2

GK14389

73

SA^bTP B4N3C5

0.9913

ABCA1	<i>ATP-Binding Cassette Transporter 1</i>
ACAT	Acil-CoA Colesterol aciltransferasa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AKH	<i>Adipokinetic Hormone</i> (Hormona adipocinética)
AM	<i>Anterior midgut</i> (Intestino medio anterior)
<i>ap</i>	<i>apterous</i>
ApoER2	<i>Apolipoprotein E Receptor 2</i>
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ATGL	<i>Adipose Triglyceride Lipase</i>
BDGP	<i>Berkeley Drosophila Genome Project</i>
CETP	<i>Cholesteryl Ester Transfer Protein</i> (Proteína transportadora de ésteres de colesterol)
CM	<i>Chylomicron</i> (Quilomicrón)
CMR	<i>Chylomicron Remnant</i> (Remanentes de quilomicrones)
Co-IP	Co-InmunoPrecipitación
Crb	Crumbs
CSPG	Crondroitín Sulfato ProteoGlicanos
DAG	Diacilglicerol
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidratado
Df	Deficiencia
DGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DGRC	<i>Drosophila Genomics Resource Center</i>
DIAP	<i>Death-associated Inhibitor of Apoptosis</i>
DSHB	<i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i>
DTT	<i>1,4-Dithiothreitol</i>
ED	<i>Extension Domain</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
<i>en</i>	<i>engrailed</i>
EYFP	<i>Enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>
FB	<i>Fat Body</i> (cuerpo graso)
FFA	<i>Free Fatty Acids</i> (Ácidos grasos libres)

ABREVIATURAS

FH	<i>Familial hypercholesterolemia</i> (Hipercolesterolemia familiar)
Flp	Flipasa recombinasa
FRT	<i>Flippase Recognition Target</i>
GC	<i>Gastric caeca</i> (divertículos gástricos)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína fluorescente verde)
h	hora
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de alta densidad)
HDLp	<i>High Density Lipophorin</i> (Lipoforina de alta densidad)
hh	<i>hedgehog</i>
HL	<i>Hepatic Lipase</i> (Lipasa hepática)
hs	<i>heat shock</i> (choque térmico)
HSPG	Heparán sulfato proteoglicanos
IDL	<i>Intermediate-Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de densidad intermedia)
Ig	Inmunoglobulina
ILP	<i>Insuline-like peptides</i> (Péptidos parecidos a la insulina)
IPC	<i>Insuline Producer cells</i> (Células productoras de insulina)
kDa	kiloDalton
LAMP	<i>Lysosomal-Associated Membrane Protein</i>
LB	<i>Laemmli Buffer</i>
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferasa
LD	<i>Lipid Droplets</i> (Inclusiones lipídicas)
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de baja densidad)
LDLp	<i>Low Density Lipophorin</i> (Lipoforina de baja densidad)
LDLR	<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i> (Receptor de Lipoproteína de baja densidad)
LLT	<i>Large Lipid Transfer</i>
Lp	Lipoforina
LPL	<i>Lipoprotein Lipase</i> (Lipoproteína lipasa)
<i>lpr1</i>	<i>lipophorin receptor 1</i> (receptor de lipoforina 1)
<i>lpr2</i>	<i>lipophorin receptor 2</i> (receptor de lipoforina 2)
LRP1-8	<i>LDLR-Related Protein 1-8</i>
LTP	<i>Lipid Transfer Particle</i>
LTPP	<i>Large Lipid Transfer Particle</i>
MAG	Monoacilglicerol
MEGF7	<i>Multiple Epidermal Growth Factor repeat-containing protein 7</i>
mg	miligramo

MHC-I	<i>Major Histocompatibility Complex-I</i> (Complejo mayor de histocompatibilidad)
min	minuto
ml	mililitro
mM	miliMolar
MMTV	<i>Mouse Mammary Tumor Virus</i> (Virus del tumor mamario de ratones)
MTP	<i>Microsomal triglyceride Transfer Protein</i>
MVB	<i>MultiVesicular Body</i> (Cuerpo multivesicular)
NCN	<i>Non-Conserved N-terminal domain</i> (Dominio N terminal no conservado)
nm	nanometro
NR	<i>Nile Red</i>
nub	<i>nubbin</i>
ONPG	<i>O-nitrophenyl-b-D-galactoside</i>
OR	Oregon R
PAF	Parafolmaldehído
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PBT	<i>Phosphate Buffer Saline + Triton X-100</i>
PC	<i>Phosphatidylcholine</i> (Fosfatidilcolina)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PCSK9	<i>Proprotein Convertase Subtilisin Kexin-like 9</i>
PD	Promotor Distal
PE	<i>Phosphatidylethanolamine</i> (Fosfatidiletanolamina)
PFA	Paraformaldehído
PLTP	<i>Phospholipid Transfer Protein</i> (Proteína transportadora de fosfolípidos)
PM	<i>Posterior Midgut</i> (intestino medio posterior)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PP	Promotor Proximal
ptc	<i>patched</i>
RAP	<i>Receptor-Associated Protein</i> (Proteína Asociada a Receptor)
RE	Retículo Endoplasmático
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase-PCR</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
shi	<i>Shibire</i>

ABREVIATURAS

SP	<i>Signal Peptide</i> (Péptido señal)
SPase	<i>Signal Peptidase</i>
SPPase	<i>Signal Peptide Peptidase</i>
Sqh	Spaguetti squash
SR-B1	<i>Scavenger Receptor- B1</i>
SRP	<i>Signal Recognition Particle</i> (Partícula de reconocimiento señal)
t.a.	Temperatura ambiente
TAG	Triacilglicerol
TAP	<i>Tandem Affinity Purification</i> (Purificación por Afinidad en Tándem)
TGN	<i>Trans-Golgi Network</i> (Red del trans-Golgi)
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
U	Unidades
UAS	<i>Upstream activation sequence</i>
VDRC	<i>Vienna Drosophila Research Center</i>
VHDLp	<i>Very High Density Lipophorin</i> (Lipoforina de muy alta densidad)
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de muy baja densidad)
VLDLR	<i>Very Low Density Lipoprotein Receptor</i> (Receptor de Lipoproteína de muy baja densidad)
w	<i>white</i>
Wg	Wingless
wt	<i>wild type</i> (silvestre)
y	<i>yellow</i>
YFP	Yellow Fluorescent Protein (Proteína fluorescente amarilla)
µg	microgramo
µl	microlitro
µm	micrómetro

- * Procesamiento del péptido señal depende de la seq. consenso -1, -3. ② Longitud de la región 100-150 aa ③ Propiedades de la n-región (cargas electrónicas, etc.)

El procesamiento suele ocurrir co-translacionalmente.

INTRODUCCIÓN

→ cleavage by SRPase: E. Myc-tagged

① α -factor inhibits the SRPase activity

② + charges downstream of the n-domain can inhibit cleavage.

③ Release of the signal peptide from the mature domain by SRPase is a prerequisite

Yeast do not have a SRP homolog, but appear to lack a comparable activity (Weihofen, 2002)

Prion Protein: length and form

⇒ Normal, SRP binds to n-region in proteins newly synthesized, prevents the degradation and guides to ribosome at SRP-receptor in the ER-membrane. Se procesa x SRPase mientras se inicia la traducción.

Hay veces que el P no se degrada, sino que se degrada ejerciendo f(x) 75. Ej. preprolactina

1. Síndrome metabólico y su relevancia

A lo largo de la historia, se han sucedido numerosas pandemias que han acabado con la vida de millones de personas. Todas ellas, debidas a enfermedades provocadas por virus o bacterias. Podemos destacar por ejemplo la gripe española que asoló al 3-5% de la población mundial durante la primera guerra mundial. La peste negra o bubónica, provocada por la bacteria *Yersinia pestis* y transmitida por vectores tales como las pulgas o las ratas, que dejó la friolera cifra de 75 millones de muertos en la primera mitad del siglo XIV. O la viruela, causada por el virus *Variola virus*, que ha sido la pandemia que más fallecidos ha provocado en la historia, además de dejar desfiguradas a millones de personas. Hoy en día, el estilo de vida sedentario y el tipo de alimentación en los países desarrollados, ha suscitado la aparición de lo que parece la nueva pandemia del siglo XXI, **el síndrome metabólico**, y que ya no está causada por agentes patógenos.

El síndrome metabólico agrupa una serie de factores de riesgo que desencadenan la aparición de enfermedades mucho más graves como enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina, diabetes, y complicaciones vasculares y cerebrales. Para padecer este síndrome es necesario reunir al menos 3 de los siguientes factores de riesgo:

- Obesidad central abdominal: circunferencia de la cintura >102 cm en hombres y >88 cm en mujeres.
- Niveles altos de triglicéridos en sangre (>150 mg/dL sangre).
- Niveles altos de glucosa en sangre (>10 mg/dL sangre).
- Niveles bajos de HDL (<40 mg/dL hombres, <50 mg/dL mujeres) .
- Presión arterial alta: sistólica (>130 mmHg) y diastólica (>85 mmHg).

El riesgo de padecer este síndrome aumenta con la edad, además, está íntimamente relacionado con el sobrepeso, la obesidad y el sedentarismo, así como otros factores como el tabaquismo. El síndrome metabólico, se da principalmente en Estados Unidos, Europa, Asia y América latina, convirtiéndose en un problema de salud pública. Según la organización mundial de la salud, en 2016 el 39% mundial tanto de hombres como de mujeres a partir de 18 años presentaban sobrepeso. En España este porcentaje es aún mayor, siendo del 61,6%. Es decir, más de la mitad de la población española es susceptible de padecer este síndrome. No sólo es alarmante la cantidad de población adulta que presenta sobrepeso, sino que en niños de entre 5 y 11 años la prevalencia es del 34,1%, cifra que va en aumento cada año y que pone en riesgo su salud. Por otra parte, la obesidad ha sido reconocida como uno de los mayores problemas de salud pública. Ésta resulta de la interacción entre la predisposición genética y factores ambientales. Sin embargo, poco se sabe sobre la naturaleza de dichas interacciones.

2. *Drosophila* como organismo modelo para el estudio del metabolismo lipídico

Desde hace al menos 100 años *Drosophila* se ha utilizado como organismo modelo en un gran número de estudios relacionados con enfermedades humanas, entre las que destacan el cáncer (Vidal and Cagan, 2006), enfermedades neurodegenerativas (Fortini and Bonini, 2000)

y enfermedades infecciosas (Dionne and Schneider, 2008). Ello es posible ya que la mayoría de genes que causan enfermedades en humanos presentan un ortólogo en *Drosophila* (Chien *et al.*, 2002). Además, muchos de los procesos fisiológicos fundamentales están conservados entre *Drosophila* y humanos. *Drosophila melanogaster* es un buen organismo modelo debido a su reducido tamaño y ciclo de vida corto que incluye 4 estadios de desarrollo: embrión, larva, pupa y adulto. Genera una gran progenie (aproximadamente en 10 días a 25°C), lo que facilita la realización de estudios genéticos. Por otra parte, presenta un genoma pequeño formado por 4 pares de cromosomas (~14.000 genes), con menos redundancia que el de vertebrados y que además, está totalmente secuenciado. Asimismo, la extensiva utilización de este organismo en el laboratorio, ha proporcionado una gran cantidad de herramientas genéticas disponibles como mutaciones y deficiencias.

En las últimas décadas, se ha incrementado el uso de este insecto para el estudio del metabolismo lipídico y la homeostasis energética (Trinh and Boulianne, 2013; Owusu-Ansah and Perrimon, 2014; Hardy *et al.*, 2015; Hirabayashi, 2016; Graham and Pick, 2017). Ello se debe a que posee las mismas funciones metabólicas básicas que los mamíferos, como la digestión o el sistema neuroendocrino. Las vías bioquímicas que controlan el almacenaje de azúcares y lípidos son también similares a las de humanos. Un claro ejemplo es la presencia de genes ortólogos a los mediadores de la cascada de señalización de la vía de la insulina, una vía altamente conservada a lo largo de la evolución. Mutaciones en estos componentes en *Drosophila* resultan en alteraciones en la esperanza de vida, el tamaño del cuerpo, la fertilidad, metabolismo de azúcares y alteraciones en los órganos que acumulan grasa. Por otra parte, *Drosophila* posee órganos funcionalmente similares al tracto digestivo de humanos, hígado, tejido adiposo, músculo y cerebro entre otros. Es decir, muchos de los órganos que controlan la absorción de nutrientes, el almacenamiento y metabolismo en los seres humanos tienen análogos en la mosca de la fruta (ver Tabla 1 y Figura 1). Tal es el caso del intestino medio (*midgut*), que actúa como el estómago e intestino de vertebrados, digiriendo y absorbiendo el alimento. El cuerpo graso realiza las funciones metabólicas del hígado y de almacenaje del tejido adiposo, ya que acumula azúcares en forma de glucógeno y lípidos en forma de triacilglicéridos (TAG) y ésteres de colesterol en inclusiones lipídicas en células semejantes a los adipocitos del tejido adiposo blanco en mamíferos. Los oenocitos, células secretoras situadas bajo la cutícula, tienen funciones parecidas a los hepatocitos y ayudan a movilizar los lípidos en condiciones de ayuno. Su papel es esencial ya que la eliminación de los oenocitos en larvas es letal (Makki *et al.*, 2014).

Tabla 1. Conservación de tejidos metabólicos entre mamíferos y *Drosophila*

Función	Mamíferos	<i>Drosophila</i>
Digestión y absorción de nutrientes	Estómago, intestino delgado	Intestino medio (<i>midgut</i>)
Almacén de lípidos	Tejido adiposo	Cuerpo graso
Movilización de lípidos	Tejido adiposo, hígado	Cuerpo graso, oenocitos
Almacén de glucógeno	Hígado	Cuerpo graso
Homeostasis de carbohidratos	Células α y β pancreáticas	Neuronas neurosecretoras, corpora cardiaca

Drosophila carece de páncreas. Sin embargo, secreta péptidos parecidos a la insulina (ILP, del inglés *insuline-like peptides*), en las células productoras de insulina (IPCs) análogas a las células β pancreáticas de mamíferos, situadas en el cerebro así como en otros tipos celulares como los adipocitos. Por otra parte, la corpora cardiaca localizada en el *ring gland* larvario, secreta la hormona adipocinética (AKH, del inglés *Adipokinetic Hormone*) similar al glucagón de las células α pancreáticas. Todos estos órganos integran la información de cambios en el entorno así como del estatus metabólico, y coordinan las actividades fisiológicas para mantener la homeostasis energética.

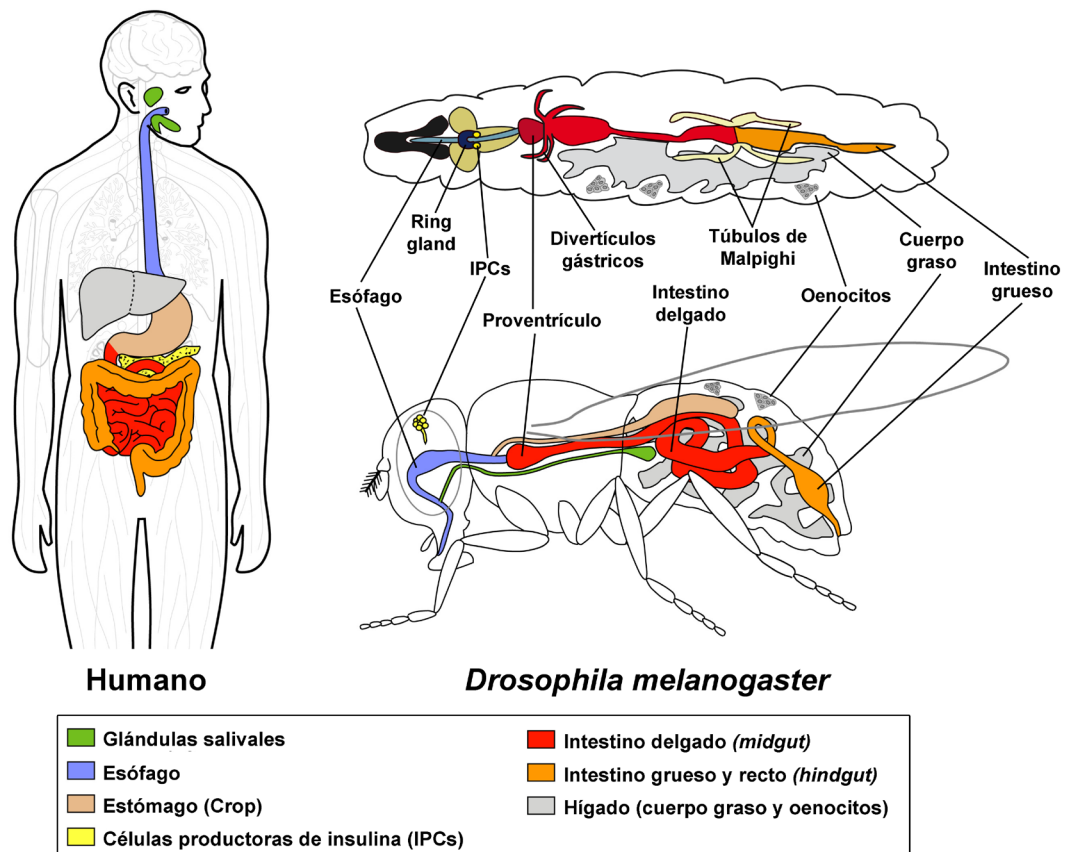


Figura 1. Los tejidos involucrados en la homeostasis metabólica son similares entre humanos y *Drosophila melanogaster*. Representación del sistema digestivo en humanos, un adulto de *Drosophila* (abajo) y una larva (arriba) en el que se aprecia que la organización es muy similar en ambas especies. Modificada de *droso4school.com* y M. Rodríguez.

Tanto en larvas como en adultos de *Drosophila*, se pueden encontrar células que acumulan grasa en forma de TAG (Arrese *et al.*, 2001; Canavoso *et al.*, 1998; Canavoso *et al.*, 2001; Canavoso and Wells, 2000; Ruden *et al.*, 2005). Varios laboratorios han aprovechado este aspecto para identificar genes que modulen la **obesidad** (Clark and Keith, 1988; De Luca *et al.*, 2005). En particular, la realización de rastreos genéticos a gran escala mediante silenciamiento de genes por ARN interferente (ARNi) o la comparación del transcriptoma en distintas condiciones metabólicas, ha permitido encontrar candidatos relacionados con la obesidad, algunos de ellos asociados también a la obesidad en ratones (Pospisilik *et al.*, 2010). Uno de estos genes fue la denominada lipasa *brummer* (*bmm*), homólogo a la lipasa adiposa de triglicéridos (ATGL/PNPLA2), que controla los niveles de almacenaje de triacilglicerol de manera dependiente a la dosis. Mutaciones en este gen en *Drosophila* y *knockout* en ratones dan lugar a individuos obesos

(Grönke *et al.*, 2005). Otro ejemplo es el gen *adipose* (*adp*), que fue identificado inicialmente en *Drosophila* (Häder *et al.*, 2003) y que codifica una proteína conservada desde invertebrados hasta vertebrados responsable de bloquear la acumulación de lípidos en los tejidos. Tanto en ratón como en humanos, los mutantes en el ortólogo a *adp*, WDTC1, presentan obesidad y resistencia a la insulina (Lai *et al.*, 2009; Suh *et al.*, 2007). Recientemente, *Drosophila* ha ido incrementando su uso como modelo para la obesidad. Hay dos tipos principales de modelos: 1) obesidad inducida por la dieta, mediante una dieta rica en azúcares (Musselman *et al.*, 2011; Pasco and Léopold, 2012; Na *et al.*, 2013) o grasas (Birse *et al.*, 2010). 2) Mediante manipulación genética: sobre-expresando o silenciando genes relacionados con el balance energético (Oldham, 2011).

Drosophila es considerado un organismo modelo para otros trastornos derivados de la obesidad como la lipodistrofia y la **diabetes** (Alfa and Kim, 2016). En estudios en larvas de *Drosophila* donde se han eliminado las células productoras de insulina (IPCs), los fenotipos resultantes recuerdan a los síntomas de la diabetes tipo I, como la alta concentración de azúcar en la hemolinfa o el retraso en el crecimiento (Broughton *et al.*, 2005; Rulifson *et al.*, 2002). Otros grupos han desarrollado modelos para la diabetes tipo II, al suministrar a las larvas una dieta rica en azúcares. Como resultado las larvas son de pequeño tamaño, con hiperglucemia, resistencia a la insulina y acumulación de grasas en forma de TAG y ácidos grasos libres (Musselman *et al.*, 2011; Pasco and Léopold, 2012). Es destacable mencionar que las moscas que siguen esta dieta rica en azúcares desarrollan defectos en el corazón (Na *et al.*, 2013). Esto, sumado a que es el único organismo modelo invertebrado con un corazón bombeante (Bodmer and Venkatesh, 1998; Diop and Bodmer, 2012), hacen de *Drosophila* un buen organismo modelo para el estudio de los mecanismos que subyacen las enfermedades cardíacas inducidas por estos síndromes.

Gracias a la conservación de las funciones metabólicas y de las rutas de señalización entre moscas y mamíferos, combinado con la amplia gama de herramientas genéticas disponibles, *Drosophila* es una valiosa fuente para comprender la compleja naturaleza de la obesidad y otras enfermedades metabólicas, así como para encontrar futuras dianas terapéuticas que ayuden a paliar los efectos de estas afecciones.

3. Familia de los receptores LDLR

La familia de los receptores de lipoproteínas de baja densidad o LDL (del inglés, *Low Density Lipoprotein Receptor*) está conservada a lo largo de la evolución e incluye algunos de los receptores de superficie mejor caracterizados (Figura 2). El más conocido y que además da nombre a la familia es el receptor LDL, descubierto en 1973 por Brown y Goldstein, cuya función principal está relacionada con la homeostasis del colesterol (Brown and Goldstein, 1986). A lo largo de los años se han ido descubriendo proteínas con homología al LDLR, tanto en humanos como en otros organismos, que han constituido la familia de los LDLR. En mamíferos, sus distintos miembros son los siguientes:

- *Low Density Lipoprotein Receptor* (**LDLR**)
- *Very Low Density Lipoprotein Receptor* (**VLDLR**)
- *LDLR- related protein 1* (**LRP1**) y *LDLR- related protein 1b* (**LRP1b**)
- *Megalin* o *LDLR- related protein 2* (**LRP2**)
- *Multiple epidermal growth factor (EGF) repeat-containing protein 7* (**MEGF7**), también llamado *LDLR- related protein 4* (**LRP4**)

- *LDLR- related protein 5 (LRP5)*
- *LDLR- related protein 6 (LRP6)*
- *Apolipoprotein E Receptor 2 (ApoER2)* o *LDLR- related protein 8 (LRP8)*

Cada uno de ellos desempeña funciones muy diversas en diferentes tejidos, tales como el desarrollo del sistema nervioso o el transporte celular de vitaminas y lípidos. Tal como se muestra en la Figura 2A, en *Drosophila* existen ortólogos correspondientes a varios miembros de esta familia. Además, en esta especie encontramos la proteína Yolkless, necesaria para la entrada de proteínas de reserva en el huevo durante la vitelogénesis y ausente en mamíferos. Estas proteínas se caracterizan por presentar una estructura en módulos proteicos característica. Concretamente, la región extracelular la componen distintas combinaciones de tres dominios proteicos diferentes: dominio LA o de unión a ligando, dominio EGF (del inglés, *Epidermal Growth Factor*) y dominio YWTD o β -propeller (Schneider and Nimpf, 2003). Además, el ectodominio puede presentar una región de O-glicosilación. Finalmente, todos estos receptores poseen un dominio transmembrana y un dominio intracelular.

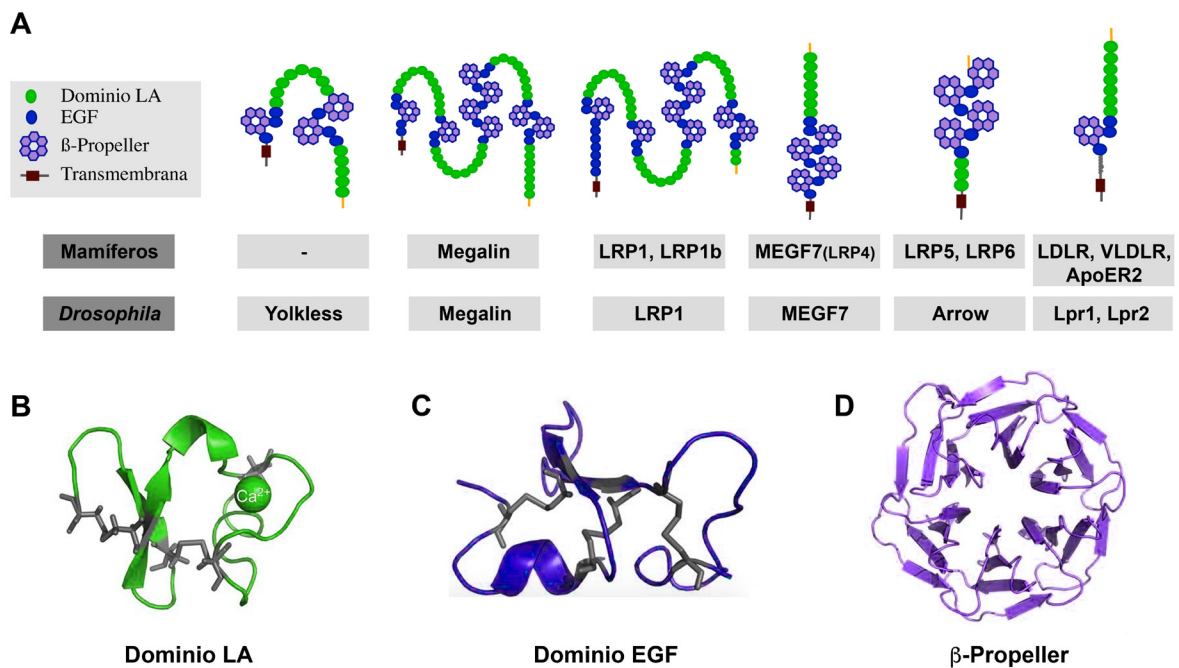


Figura 2. Familia de las proteínas LDLR. (A) Representación de los distintos miembros de la familia de los receptores de lipoproteínas de baja densidad y su composición de dominios, tanto en mamíferos como en *Drosophila*. (B-D) Estructura terciaria de los dominios que componen la región extracelular de estos receptores: Dominio LA (B), EGF (C) y β -propeller (D). Los puentes disulfuro están marcados en gris, las láminas β en forma de flecha y las α hélices formando una espiral. Modificado de Andersen *et al.*, 2013.

A continuación, describiremos las principales características de cada uno de estos dominios:

- **Dominio LA o de unión a ligando:** Dominio de 30-40 aminoácidos que forman dos láminas β antiparalelas. Se caracteriza por contener 6 cisteínas conservadas formando tres puentes disulfuro entre ellas (C1-C3, C2-C5 y C4-C6) (Figura 2B). Adicionalmente, presentan en la región C-terminal una serie de residuos cargados negativamente (DCxDxSDE) de vital importancia para la coordinación de un ión calcio (Ca^{2+}), crítico para el correcto

plegamiento y el mantenimiento de la integridad del dominio (Blacklow and Kim, 1996; Atkins *et al.*, 1998). Cada dominio LA está conectado con el siguiente por cortas regiones flexibles (*linker*) (Beglova *et al.*, 2001). Tradicionalmente, se ha propuesto que la interacción de los ligandos con estos receptores tenía lugar en estos dominios. Por ejemplo, las partículas LDL se unen al receptor LDLR en la región LA3-LA7 (Esser *et al.*, 1988 y Russell *et al.*, 1989). Su vital importancia se ve reflejada en que un gran número de mutaciones identificadas en los residuos que coordinan el calcio o que forman parte de los puentes disulfuro de los dominios LA del LDLR humano provocan hipercolesterolemia familiar (FH, del inglés *Familial Hypercholesterolemia*), una enfermedad genética originada por la falta de función del LDLR y que consiste en una elevada concentración de colesterol en plasma (Fass *et al.*, 1997).

- **Dominio EGF** (del inglés, *Epidermal Growth Factor*): Este dominio contiene entorno a 40-50 aminoácidos formando dos pares de cortas láminas β antiparalelas (Figura 2C). Se pueden encontrar solos o en grupo de dos. Al igual que el dominio LA, también presenta 6 cisteínas conservadas. Sin embargo, éstas forman un patrón de puentes disulfuro distinto (C1-C3, C2-C4, C5-C6). Mutaciones en estos dominios no afectan la unión del receptor con los ligandos, pero sí pueden interferir con la disociación de los ligandos en los endosomas, afectando así al reciclaje del receptor, como ocurre con el receptor LDLR y la partícula LDL (Hobbs *et al.*, 1992).

- **Dominio YWTD o β -propeller**: Está compuesto por 6 grupos de 4 láminas β antiparalelas generando cada uno una estructura circular en hélice (*propeller*). Repeticiones YWTD están presentes en cada lámina β y dan lugar al nombre del dominio. Suele ir flanqueado por un dominio EGF que le confiere estabilidad y permite su correcto plegamiento con la ayuda de la chaperona Mesd/Boca (Figura 2D) (Culi *et al.*, 2004). Se ha demostrado que los dominios β -propeller se unen a otros dominios de la misma proteína, provocando un cambio conformacional necesario para su actividad. Por ejemplo, el pH ácido de los lisosomas induce que los dominios LA4 y LA5 del receptor LDLR se plieguen e interaccionen con el β -propeller, permitiendo la disociación del ligando LDL del receptor y su reciclaje (Rudenko *et al.*, 2002).

- **Dominio de O-Glicosilación**: Está presente en algunos, pero no todos los miembros de la familia LDLR, por ejemplo, está ausente en Megalin (LRP2). Es un dominio de longitud variable que contiene una gran cantidad de residuos de serina y treonina susceptibles de sufrir un proceso de O-glicosilación (Willnow, 1999; Herz and Bock, 2002). Todavía no está clara su función. Inicialmente se pensaba que tenía un papel estructural creando un espacio entre el ectodominio y la región transmembrana y aportando de esta manera estabilidad al receptor (Kingsley *et al.*, 1986; Magrané *et al.*, 1999). Sin embargo, su función debe ser más sutil ya que se ha observado que tanto en los receptores humanos VLDLR y ApoER2 como en los receptores de lipoforinas de la mayoría de los insectos hay distintas isoformas que se diferencian en este dominio, sugiriendo que no es esencial para la estabilidad de estas proteínas (Martensen *et al.*, 1997; Iijima *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 1998; Clatworthy *et al.*, 1999; Magrané *et al.*, 1999; Sun and Soutar, 1999; Korschineck *et al.*, 2001).

- **Dominio transmembrana**: De pequeño tamaño (entorno a 24 aminoácidos). Forma una alfa hélice y es de un solo paso. Es imprescindible para la función del receptor.

- **Dominio intracelular o citoplásmico**: Desempeña un papel indispensable en la endocitosis mediada por clatrina gracias a la presencia de la secuencia [F/Y] x NP x Y, que media la interacción con la maquinaria endocítica. Todos los miembros de esta familia poseen al menos una copia de esta secuencia. Asimismo, se ha demostrado una función directa en

transducción de señales por la unión de proteínas adaptadoras citoplásmicas, por ejemplo, Dab1 (Lakomá *et al.*, 2011). Además, el dominio intracelular puede poseer secuencias requeridas para la correcta localización subcelular del receptor. Por ejemplo, para dirigir el LDLR hacia membranas basolaterales (Yokode *et al.*, 1992; Koivisto *et al.*, 2001), o hacia el dominio apical para la proteína Megalin (Takeda *et al.*, 2003).

4. Caracterización de los dominios de interacción entre miembros de la familia LDLR y sus ligandos

Una de las razones por la cual los receptores de la familia LDLR desempeñan funciones tan diversas se debe a que tienen la capacidad de unir una amplia variedad de ligandos. El receptor clásico que representa a esta familia es el LDLR. Su mecanismo de acción ha sido uno de los ejemplos más empleados a la hora de estudiar la endocitosis mediada por receptor. El LDLR se encuentra ampliamente distribuido en el organismo, pero se expresa a altos niveles en el hígado. Su función principal consiste en mediar la endocitosis y eliminación de las lipoproteínas LDL (del inglés, *Low Density Lipoprotein*) y así mantener la homeostasis del colesterol. Mutaciones en este receptor llevan a un fuerte incremento de los niveles de colesterol en sangre y al desarrollo de enfermedades de las arterias coronarias y aterosclerosis, principales causas de mortalidad en las sociedades occidentales, de ahí la importancia de estudiar su mecanismo de acción. A lo largo de los años se han ido caracterizando distintos ligandos y sus sitios de unión con el receptor. A continuación, describiremos los ejemplos más significativos, aunque nos centraremos principalmente en la interacción con la lipoproteína de baja densidad o LDL a través de la Apolipoproteína B (ApoB):

- **ApoB.** La lipoproteína de baja densidad o LDL es el transportador de colesterol más abundante en el torrente sanguíneo y por esta razón, la interacción entre el LDLR y las LDL ha sido analizada en detalle. Cada partícula de LDL contiene una única molécula de la Apolipoproteína B. Existen dos tipos de ApoB: ApoB-100 y ApoB-48 producidas en el hígado y en el intestino respectivamente, que derivan del mismo gen a través de un proceso de edición del ARNm. La primera de ellas, ApoB-100, está compuesta por 4536 aminoácidos, siendo una de las mayores proteínas existentes. Debido a la dificultad para trabajar con ella como proteína aislada, los estudios estructurales han sido limitados.

La partícula LDL cargada de colesterol se une al receptor en los dominios de unión a ligando o LA. Gracias a estudios bioquímicos se conoce que la región esencial para esta interacción abarca LA3-7 más el dominio EGF-A (Esser *et al.*, 1988; Russell *et al.*, 1989). Asimismo, existen análisis que evidencian que los dominios LA son los más importantes, ya que usando minirreceptores recombinantes se observó que aquel que contenía sólo los dominios LA tenían la capacidad de unir LDL *in vitro* (Simmons *et al.*, 1997).

La región de unión en ApoB se localiza principalmente en la zona C-terminal de la proteína, concretamente en el denominado sitio B (residuos 3359-3369 ricos en alanina y arginina) (Borén *et al.*, 1998). Se piensa que la unión LDLR-LDL es electrostática, ya que la superficie de ApoB presenta una carga neta positiva gracias a los residuos de Ala y Arg del sitio B mientras que los dominios LA del LDLR poseen carga negativa. Por otro lado, se ha demostrado que la afinidad del LDL con el receptor depende también del tamaño de la partícula. Partículas pequeñas tienen menos afinidad que partículas grandes (Clavey *et al.*, 1995).

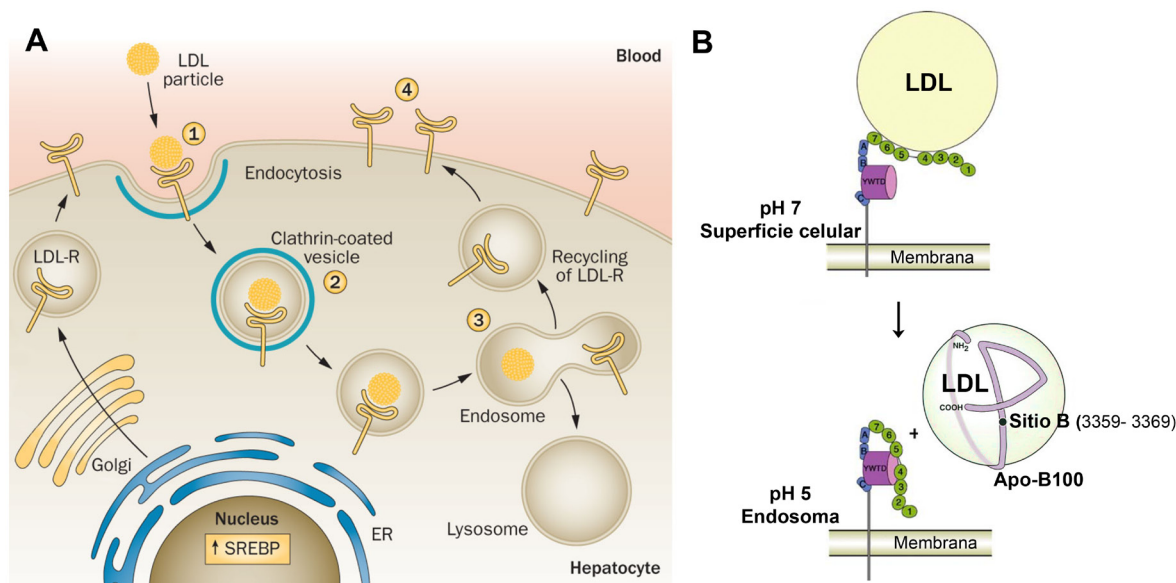


Figura 3. Interacción de ApoB-100 de las partículas LDL con los receptores LDLR y endocitosis. (A) Esquema general del proceso. Cuando las células presentan niveles bajos de colesterol, el factor de transcripción SREBP se procesa activando la transcripción de los receptores LDLR. (1) La partícula LDL circulante se une al receptor LDLR. (2) El complejo LDL-LDLR se endocita al interior celular mediante vesículas rodeadas de clatrina. (3) Una vez en el endosoma el complejo LDL-LDLR se disocia debido al bajo pH lisosomal. Como consecuencia de ello, la partícula LDL se libera y el receptor puede reciclarse hacia la superficie celular, (4) para que se repita el ciclo. Modificado de Reiner, 2015. (B) Representación esquemática del proceso de liberación de la partícula LDL. A pH neutro, la Apolipoproteína B100 se une al dominio extracelular del receptor, concretamente en los dominios de unión LA3-7, a través de su sitio B. La liberación del ligando se produce a pH lisosomal, debido a un cambio conformacional del receptor producido por la interacción de los dominios LA4 y LA5 con el dominio β-propeller. Tomada y modificada de Borén *et al.*, 1988a y Jeon and Blacklow, 2005.

Una vez unidas, se produce la internalización del complejo ligando-receptor vía endocitosis mediada por clatrina. En el interior de la célula, el complejo se deshace a pH lisosomal (Figura 3A). Ello se debe a que en estas condiciones, el dominio extracelular del receptor sufre un cambio conformacional plegándose sobre sí mismo debido a la unión de los dominios LA4-5 con el β-propeller, cambiando a una disposición cerrada en contraste con su disposición elongada que adopta a pH fisiológico (Rudenko *et al.*, 2002; Innerarity, 2002) (Figura 3B). Se comprobó que el dominio LA7 junto con EGF-A también participan en el proceso de liberación del ligando en los lisosomas, creando una región rígida donde tres residuos de histidina son de vital importancia para la disociación de la partícula (Jeon and Blacklow, 2003). De esta manera, la partícula LDL se degrada liberando su contenido a la célula, mientras que el receptor es reciclado a la superficie celular.

- **ApoE.** Junto con ApoB, es una de las apolipoproteínas mayoritarias de mamíferos. Es bastante más pequeña que la anterior, teniendo tan sólo 299 aminoácidos. Se encuentra principalmente formando parte de los quilomicrones, remanentes de quilomicrones y VLDL, y a diferencia de la ApoB, existen varias copias de ApoE en cada partícula. Su deficiencia

deriva en una enfermedad denominada disbetalipoproteinemia, dando lugar a niveles altos de colesterol y triglicéridos en sangre (Schneider *et al.*, 1981). Estudios bioquímicos con proteínas recombinantes desvelaron que los dominios LA4-5 del LDLR eran suficientes para unir ApoE al receptor. No obstante, los dominios LA4 y LA5 por sí solos no tendrían esta capacidad (Fisher *et al.*, 2004). Por otra parte, la región N-terminal de la ApoE (residuos 130-160 y R172) rica en Arginina y Lisina, le confiere una carga neta positiva en su superficie, promoviendo de esta manera su interacción con el receptor (Fisher *et al.*, 2004; Innerarity *et al.*, 1983; Weisgraber *et al.*, 1982; Lalazar *et al.*, 1988; Zaiou *et al.*, 2000 y Morrow *et al.*, 2000).

- **Proteína RAP** (del inglés, *Receptor-Associated Protein*), es una chaperona residente en el retículo endoplasmático necesaria para la maduración de muchos miembros de la familia de los LDLR. Además, previene la asociación prematura del receptor con sus ligandos a lo largo de la ruta secretora, facilitando así el tránsito del receptor hacia la superficie celular (Bu *et al.*, 1995; Willnow *et al.*, 1995, 1996). Se comprobó como la proteína RAP se une al receptor en los dominios de unión a ligando (LA) previamente descritos, concretamente la región de interacción comprende LA2-5 (Fisher *et al.*, 2006; Guttman and Komives, 2011 y Kurasawa *et al.*, 2013).

- **Factor VIII de coagulación de la sangre (FVIII)**. Este ligando es un claro ejemplo de la versatilidad del LDLR, ya que su función no está relacionada con el metabolismo lipídico. El Factor VIII es un cofactor que activa al Factor IX de la vía intrínseca de la coagulación de la sangre. La deficiencia del FVIII provoca hemofilia A (Fay, 2006). El receptor LDLR actúa junto con el receptor LRP1 para captarlo del plasma disminuyendo de esta manera su vida media (Bovenschen *et al.*, 2005). La región del receptor destinada a la unión con el FVIII coincide con la región que interacciona con la proteína RAP, abarcando LA2-5 (Kurasawa *et al.*, 2013).

La comparación de los sitios de unión del LDLR con sus ligandos muestran que los dominios LA4-5 están implicados en la mayoría de esas interacciones. Notablemente, este doblete posee una zona de unión entre dominios (*linker*) inusualmente larga comparada con el resto, proporcionándoles más flexibilidad para adaptarse a los diferentes ligandos. Además, el dominio LA5 presenta una afinidad significativamente mayor para el calcio (Ca^{2+}) que cualquier otro dominio LA (Guttman and Komives, 2011). Por otra parte, LA5 por sí solo no es suficiente para la unión del receptor con los ligandos sino que el contexto en el que reside también es crítico para maximizar el reconocimiento y la unión (Yamamoto and Ryan, 2009).

Hay que destacar que no sólo se han descrito interacciones a través de los dominios LA para el receptor LDLR, sino también para otros miembros de esta familia como por ejemplo, los receptores VLDLR y ApoER2, que interaccionan con la proteína Reelin (Hiesberger *et al.*, 1999) y las proteínas de la matriz extracelular tales como Trombospondina y F-espondina (Blake *et al.*, 2008 y Hoe *et al.*, 2005), todas ellas asociadas con la migración neuronal. Por otro lado, se han identificado interacciones en prácticamente todas las regiones de las proteínas previamente mencionadas. Tal es el caso del dominio EGF-A del receptor LDLR al cual se une la glicoproteína PCSK9 (del inglés, *Proprotein Convertase Subtilisin Kexin-like 9*). Esta proteína controla los niveles de colesterol en plasma promoviendo la degradación del receptor (Gu *et al.*, 2013). Otro claro ejemplo son los receptores LRP5/6 (y arrow, su ortólogo en *Drosophila*), que actúan como co-receptores junto con Frizzled de las proteínas Wnt (*wingless* en *Drosophila*) para la transducción de señales de esta importante vía implicada en el desarrollo. Esta interacción se ha visto que tiene lugar en uno de los dominios β -propeller (YWTD) (Kikuchi *et al.*, 2007).

5. Comparación del transporte de lípidos en mamíferos e insectos

5.1. Metabolismo lipídico: Las lipoproteínas

Los lípidos son biomoléculas orgánicas esenciales para el desarrollo de la vida cuyas funciones principales son: a) reserva energética del organismo, en forma de triacilglicéridos (TAG), b) función estructural, formando parte fundamental de las membranas celulares (fosfolípidos) y c) como precursores de vitaminas, hormonas esteroideas, prostaglandinas (colesterol) y mensajeros secundarios. Para poder ejercer su correcta función y llegar a los órganos diana, los lípidos están continuamente circulando en el organismo a través de medios acuosos extracelulares como, el sistema circulatorio en mamíferos o la hemolinfa en insectos. Sin embargo, una característica básica de estas moléculas es su hidrofobicidad, es decir, son insolubles en agua. Esta particularidad hace que requieran de mecanismos especiales para su transporte. Concretamente, son transportadas en unas partículas denominadas lipoproteínas, presentes tanto en invertebrados como en vertebrados.

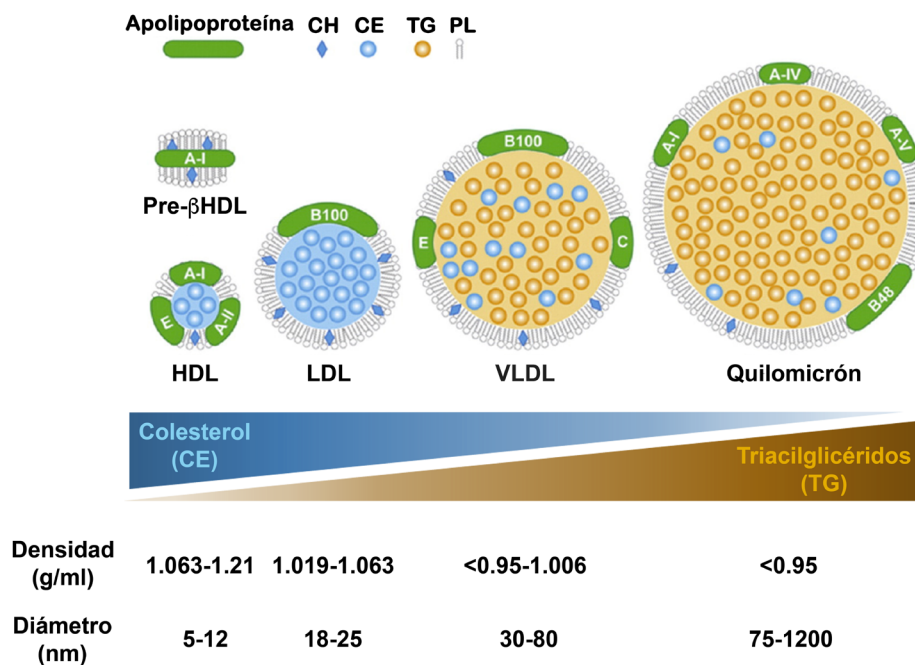


Figura 4. Clasificación general de las lipoproteínas de mamíferos. Se muestran las diferentes clases de lipoproteínas (HDL, LDL, VLDL y quilomicrones) clasificadas según su densidad. El tamaño puede oscilar entre los 5 nm de las HDL hasta los 1200 nm de los quilomicrones (las lipoproteínas no están representadas a escala). Cada lipoproteína está formada por una capa externa compuesta por una monocapa de fosfolípidos (PL), colesterol libre (CH), y una o varias clases de apolipoproteínas. En su interior se localizan principalmente los triacilglicéridos (TG) y los ésteres de colesterol (CE). El contenido lipídico varía según el tipo de lipoproteína, por ejemplo, las LDL están formadas principalmente de ésteres de colesterol, sin embargo, los quilomicrones de triacilglicéridos. Tomada y modificada de Thaxton *et al.*, 2016.

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares generalmente globulares compuestos por lípidos y proteínas. Los LÍPIDOS están empaquetados en un núcleo hidrofóbico que contiene

lípidos neutros (triacilglicerol, ésteres de colesterol y pequeñas cantidades de colesterol libre y otros lípidos, como pueden ser vitaminas liposolubles) y que están rodeados por una monocapa anfipática compuesta de fosfolípidos y colesterol libre. Las PROTEÍNAS que forman parte de las lipoproteínas se denominan apolipoproteínas y son esenciales para estabilizar y regular estas partículas. Estas proteínas se clasifican en dos grandes grupos: intercambiables y no intercambiables. Las no intercambiables son un componente integral de la partícula y no se pueden extraer sin destruir el complejo. Las principales son ApoB-100 y ApoB-48, presentes en la mayoría de lipoproteínas, de gran tamaño e insolubles en agua. Por otra parte, las apolipoproteínas intercambiables ApoA-I, ApoA-II, ApoC o ApoE son de menor tamaño y poseen cierta solubilidad en agua. Se incorporan o extraen de las lipoproteínas de forma dinámica durante la vida de las mismas.

En mamíferos las lipoproteínas se sintetizan en el retículo endoplasmático de enterocitos y hepatocitos a la vez que ocurre su lipidación con la ayuda de un cofactor denominado MTP (del inglés, *Microsomal Triglyceride transfer Protein*) (Olofsson *et al.*, 1999). Existen una amplia variedad de lipoproteínas según su densidad (Figura 4). Dependiendo del contenido relativo de lípidos y proteínas se clasifican en: Quilomicrones (CM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). En insectos la lipoproteína más abundante es la **lipoforina** (Lp), la cual describiremos extensamente más adelante.

5.2. Metabolismo de los TAG en mamíferos (quilomicrones, remanentes de quilomicrones y VLDL)

Los triacilglicéridos (TAG) son la mayor reserva energética del organismo. Este lípido está compuesto por una molécula de glicerol esterificada por sus grupos hidroxilos a tres ácidos grasos, los cuales pueden ser saturados o insaturados y de longitud variable (Figura 5A). Esta molécula altamente energética es totalmente hidrofóbica, por tanto, no forma ni micelas ni bicapas como otros lípidos. Esto le permite ser almacenadas en grandes cantidades sin alterar el funcionamiento normal de la célula (Farese and Walther, 2009).

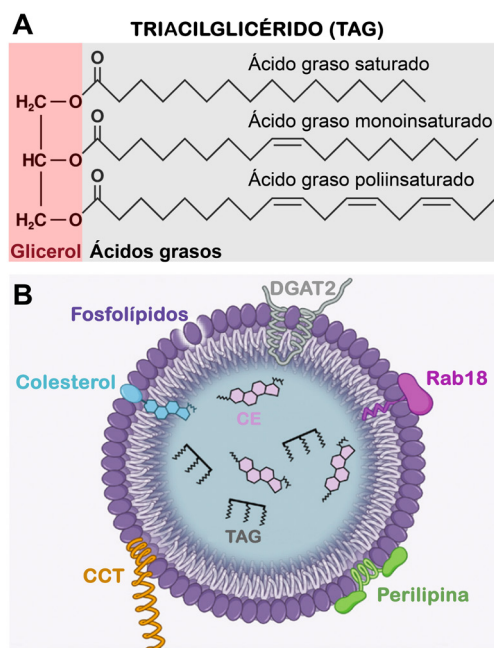


Figura 5. Estructura y composición de las inclusiones lipídicas (LD). (A) Representación estructural de un triacilglicérido (TAG), compuesto por una molécula de glicerol (rojo) esterificado a tres ácidos grasos (gris). (B) Características estructurales de una inclusión lipídica. El núcleo lo componen TAG y ésteres de colesterol (CE). Este núcleo se encuentra rodeado por una monocapa de fosfolípidos que contiene además de colesterol, varias proteínas en su superficie. Tomada y modificada de Krahmer *et al.*, 2009 (snapshot).

Los TAG se almacenan intracelularmente en inclusiones lipídicas, denominadas en inglés *Lipid Droplets* (LD) (Figura 5B). Estos compartimentos intracelulares tienen similitudes con las lipoproteínas, ya que están compuestos por un núcleo de lípidos neutros rodeados por una monocapa de lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol). No obstante, difieren en su mayor tamaño (entre 1-100 μm), localización (citósol) y las proteínas de su superficie, ya que en lugar de apolipoproteínas contienen otras proteínas específicas para la regulación de sus funciones.

Metabolismo de las lipoproteínas ricas en TAG:

En las sociedades occidentales existe una relación directa entre niveles altos de lípidos en sangre y el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (Nordestgaard *et al.*, 2007). Por esta razón, se ha experimentado un renacimiento en el estudio de las lipoproteínas y su regulación. El metabolismo de las lipoproteínas ricas en TAG sigue principalmente dos rutas: **exógena** y **endógena**. En la primera de ellas, los lípidos procedentes de la ingesta se encapsulan en lipoproteínas muy ricas en TAG en el intestino (quilomicrones, CM) para su distribución por el cuerpo a través del torrente linfático y sanguíneo. En la ruta endógena, se producen las partículas VLDL en el hígado durante condiciones de ayuno. Posteriormente, estas lipoproteínas se transportan por el torrente sanguíneo a los tejidos periféricos como fuente de energía entrando en el ciclo de la β oxidación o almacenándose en el tejido adiposo (Fielding and Fielding, 2008).

En la RUTA EXÓGENA (Figura 6, panel izquierdo), la hidrólisis de los lípidos provenientes de la dieta se inicia en el estómago mediante las lipasas gástricas después de su emulsificación por las sales biliares, produciéndose ácidos grasos libres y 2-monoacilglicerol. Estos compuestos pasan al interior de las células del intestino (enterocitos) a través de transportadores de ácidos grasos localizados en su membrana. En estas células, los ácidos grasos y el colesterol son re-esterificados a TAG y a ésteres de colesterol en el RE por la acción de las enzimas Acil coenzima A diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) y Acil CoA: colesterol aciltransferasa (ACAT) respectivamente. Ambos productos son empaquetados en quilomicrones (CM) junto con la Apolipoproteína B-48. Posteriormente, se adicionan las apolipoproteínas intercambiables ApoE, ApoC-II y ApoC-III. La síntesis de los quilomicrones es un proceso complejo que requiere la actividad de cofactores específicos como el MTP (del inglés, *Microsomal Triglyceride Transfer Protein*), proteína de la familia de la ApoB. Una vez sintetizados, los CM pasan al sistema linfático y de ahí al sistema circulatorio donde son transportados a los tejidos diana (músculo esquelético o tejido adiposo). En ellos, los CM interactúan con la pared endotelial de los microcapilares, rica en la enzima lipasa de lipoproteínas (LPL, del inglés, *Lipoprotein Lipase*). Esta enzima es activada por la ApoC-II presente en los CMs, promoviendo de esta manera la hidrólisis de los TAG y la liberación de los ácidos grasos que son transportados a través del endotelio para posteriormente ser metabolizados en las células de los tejidos periféricos (Hagberg *et al.*, 2010). El contenido en TAG de esas partículas se va reduciendo progresivamente, disminuyendo de tamaño y aumentando su densidad, y generándose de esta manera los denominados remanentes de quilomicrones (CMR, del inglés, *Chylomicron Remnant*). Los CMR son transportados por el torrente circulatorio hacia el hígado para ser eliminados mediante receptores específicos presentes en la superficie de los hepatocitos: el receptor LDLR y de forma redundante, el receptor LRP1 (Fielding, 2008). Los CMR interactúan con el receptor mediante la ApoE que contienen y son internalizados por endocitosis y catabolizados en los lisosomas por la lipasa ácida. Estos CMR son ricos en ésteres de colesterol que son liberados en los hepatocitos y reutilizados para la formación de sales biliares y excretados en la bilis o incorporados a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) generadas en el hígado.

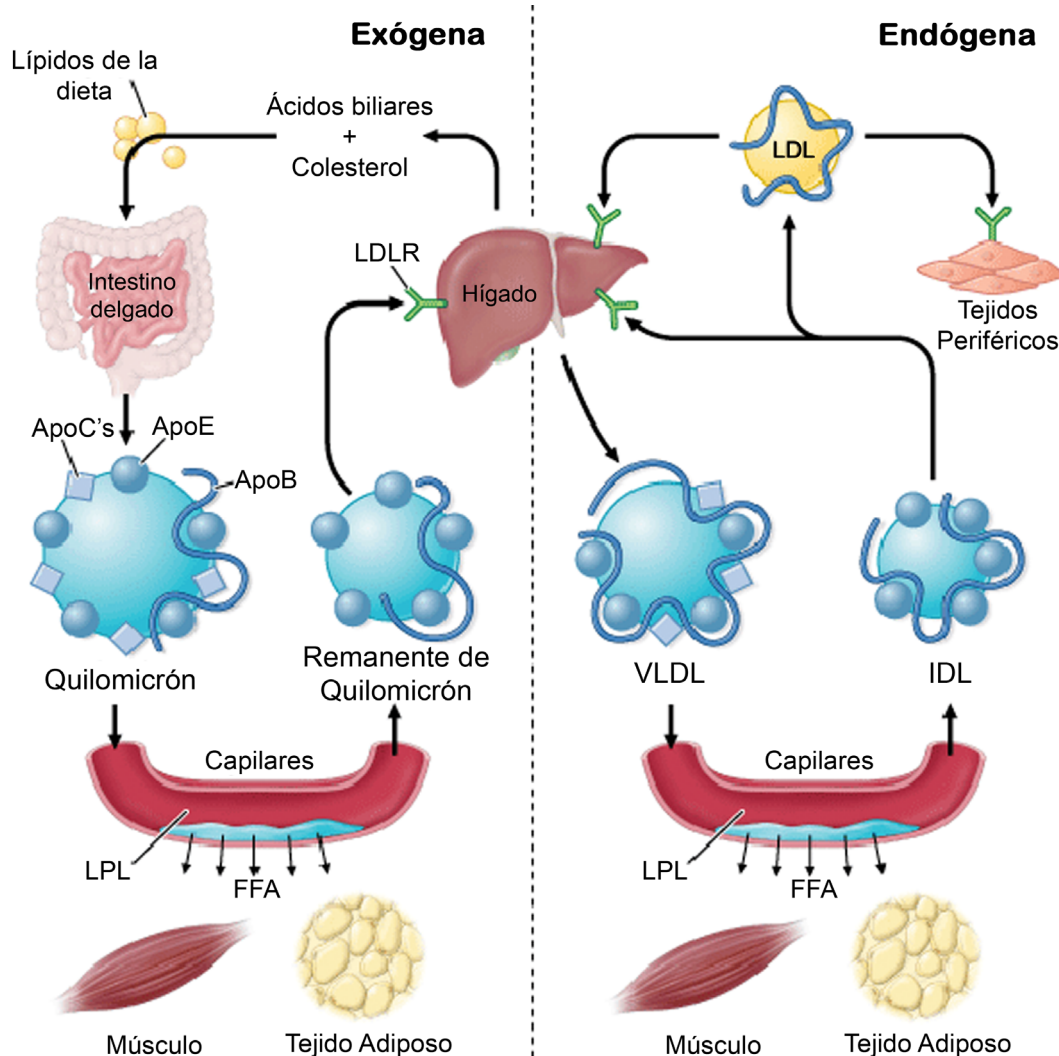


Figura 6. Esquema general de las vías endógenas y exógenas del metabolismo de los triacilglicéridos (TAG) en mamíferos. El TAG presente en circulación puede originarse a partir de dos vías diferentes, la vía endógena y la exógena. La exógena se inicia en el intestino, donde se generan quilomicrones ricos en TAG a partir de los lípidos dietarios. La vía endógena se inicia en el hígado, donde se generan las lipoproteínas VLDL. LPL (Lipoproteína Lipasa), FFA (ácidos grasos libres). Tomada de Fauci *et al.*, 2008.

En la RUTA ENDÓGENA (Figura 6, panel derecho) se transportan TAG y colesterol a los tejidos periféricos en condiciones de ayuno. En el hígado se sintetizan TAG y ésteres de colesterol utilizando como sustrato ácidos grasos y carbohidratos. A continuación, éstos se empaquetan en lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL. Su síntesis y secreción ocurre de manera similar a los quilomicrones y también requiere de la acción de MTP en el RE. Sin embargo, la isoforma de la ApoB que los constituye es ApoB-100. Las lipoproteínas VLDL son liberadas al torrente circulatorio, donde son procesadas en los microcapilares por las lipasas de lipoproteínas (LPL) de forma semejante a los quilomicrones, liberando ácidos grasos libres y glicerol a los tejidos periféricos. Una vez procesadas, pasan a ser remanentes de VLDL, o también denominadas IDL (lipoproteínas de densidad intermedia), siendo de menor tamaño y más densas, las cuales son eliminadas de la circulación en el hígado gracias a los receptores LDLR que se localizan en la superficie de los hepatocitos. Las IDL pueden también ser procesadas en mayor grado

por lipasas hepáticas (HL, del inglés *Hepatic Lipase*), una enzima extracelular localizada en el endotelio de los sinusoides hepáticos y en la superficie de los hepatocitos, formando partículas muy ricas en colesterol denominadas lipoproteínas de baja densidad o LDL, siendo aún más densas y de menor tamaño que las anteriores. Como hemos comentado en el apartado anterior la mayor parte de las partículas LDL son eliminadas por el hígado gracias a la interacción con los receptores LDLR. El resto de LDL libre en el organismo es retirado por células extra-hepáticas por una vía de receptores scavenger.

5.3. Metabolismo del colesterol en mamíferos y proteínas de transferencia de lípidos (CETP) y fosfolípidos (PLTP)

Las principales lipoproteínas encargadas de transportar el colesterol son las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Estas últimas son las más pequeñas y las más densas de todas. Se sintetizan tanto en el intestino como en el hígado y tienen una morfología completamente diferente al resto de lipoproteínas, siendo achatadas en lugar de esféricas (Figura 4, pre β -HDL). Principalmente contiene Apolipoproteína A-I (ApoA-I) en su superficie (entre 1-4 moléculas), además de ApoA-II, ApoA-IV, ApoC y ApoE. La lipoproteína HDL se encarga de recoger el colesterol libre de los tejidos periféricos y llevarlos de vuelta al hígado, donde será procesado para excretarlo en la bilis. A este proceso se le conoce como **transporte reverso del colesterol** (Fielding and Fielding, 1995).

El colesterol no esterificado acumulado en los tejidos periféricos se libera al exterior celular a través de transportadores específicos presentes en la membrana, principalmente ABCA1 (del inglés, *ATP-binding Cassette transporter*) (Figura 7). Este transportador media la unión de partículas ricas en ApoA circulantes a la superficie celular y su lipidación mediante la transferencia de colesterol. En las HDL (denominadas en este caso pre β -HDL) se esterifica dicho colesterol libre por la acción de una enzima asociada a ella denominada Lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) que es activada por la ApoA-I. Esta enzima cataliza la transferencia de un ácido graso procedente de la fosfatidilcolina (PC) al colesterol para crear un éster de colesterol, los cuales ocuparán el núcleo de la partícula. Esta reacción necesita un aporte continuo de fosfolípidos (principalmente PC), que se obtienen desde otras lipoproteínas circulantes mediante la acción de la **proteína de transferencia de fosfolípidos** o **PLTP**. Concretamente, media la transferencia de fosfolípidos desde las lipoproteínas que transportan TAG (CM, CMR y VLDL) hacia las HDL durante la lipólisis de estos triglicéridos (Huuskonen *et al.*, 2001). Además de transferir fosfolípidos, es capaz de ceder otros componentes anfipáticos como colesterol libre, lipopolisacáridos (LPS) y vitamina E (Hailman *et al.*, 1996 y Jiang *et al.*, 2002).

Tanto mutaciones en ABCA1 como en PLTP producen dislipidemias. La pérdida de función en ambos alelos del gen de ABCA1 en humanos y ratones produce una deficiencia en HDL y la acumulación de colesterol en macrófagos de tejidos periféricos, la denominada enfermedad de Tangier (Ceccani *et al.*, 2016). La ausencia de PLTP en ratones provoca una reducción del 60% de lípidos y de ApoA-I en HDL (Jiang *et al.*, 1999). No obstante, no se han encontrado deficiencias genéticas en humanos del gen de PLTP. Una vez que la HDL se ha cargado de ésteres de colesterol y tras sucesivos ciclos, la partícula va agrandándose y adoptando una forma esférica transformándose en HDL₃. La cual, circula en plasma para seguir recibiendo colesterol y fosfolípidos de otras lipoproteínas.

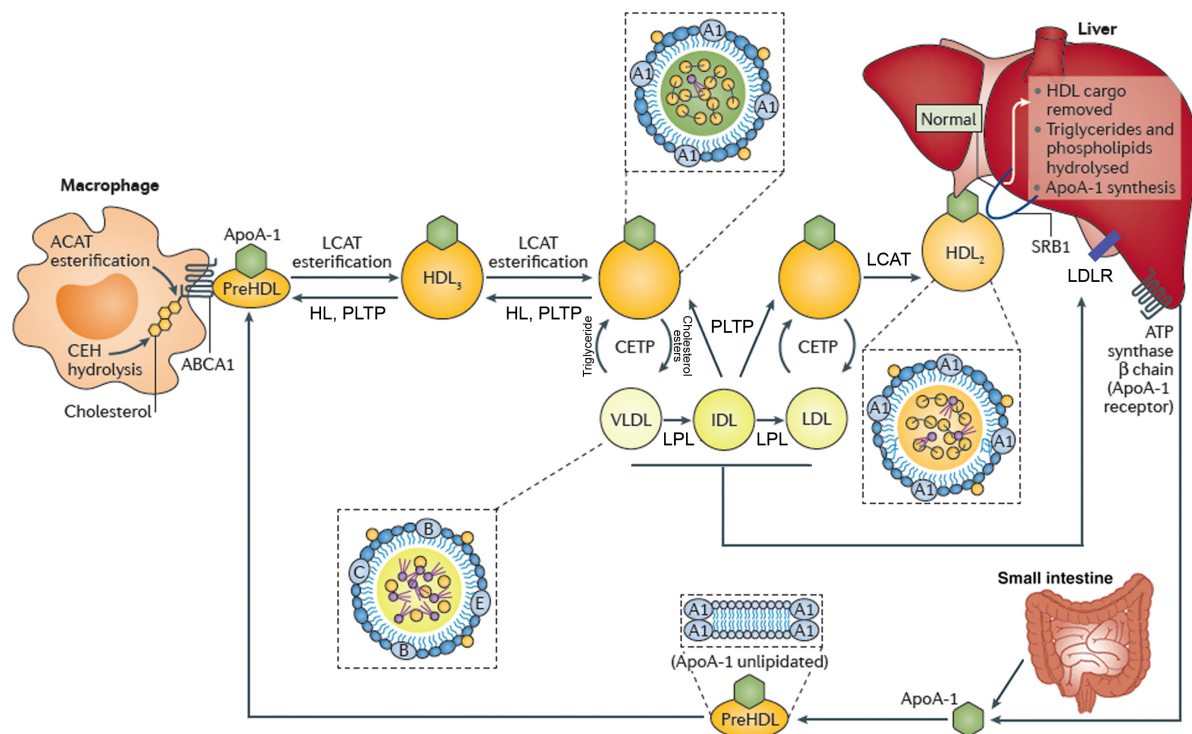


Figura 7. Metabolismo de las HDL y transporte reverso del colesterol. La ApoA-I se sintetiza tanto en el hígado como en el intestino y posteriormente es liberada al torrente sanguíneo. Allí se genera pre β -HDL que circula hasta que se une al receptor ABCA1 de macrófagos o de cualquier tejido periférico. La unión promueve la activación de la enzima colesterol éster hidrolasa (CEH) liberando y transfiriendo colesterol a la superficie de la partícula HDL. El colesterol libre es re-esterificado por la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) y acumulado en el interior de la partícula HDL. Durante este proceso la lipoproteína pobre en lípidos HDL₃ pasa a HDL₂. Este proceso (HDL₂ a HDL₃) puede ser invertido por la acción de las lipasas hepáticas (HL) y la transferencia de fosfolípidos mediante el transportador PLTP. En el torrente sanguíneo, la proteína de transferencia de ésteres de colesterol o CETP permite el intercambio de parte de los ésteres de colesterol a otras lipoproteínas VLDL, IDL y/o LDL y a su vez la transferencia de triacilglicéridos a los HDL. También tiene lugar la transferencia de fosfolípidos a través del transportador específico PLTP desde las lipoproteínas anteriores hacia las HDL. Las lipoproteínas VLDL, IDL y LDL pueden ser endocitadas en el hígado a través de los receptores LDLR donde serán procesadas. Las partículas HDL₂ cargadas de ésteres de colesterol, se unen a los receptores SRB1 presentes en el hígado para su procesamiento por lipasas hepáticas y su posterior eliminación. Una vez que descargan su contenido lipídico, las pre β -HDL o HDL₃ se liberan y vuelven a la circulación para repetir el ciclo. LPL: lipoproteína lipasa. Modificada de Varici, 2016.

Los ésteres de colesterol generados por LCAT en HDL₃ pueden ser transferidos por un transportador específico **CETP** (del inglés, *cholesteryl ester transfer protein*) a otras lipoproteínas: VLDL, IDL, ó LDL y viceversa (Hesler *et al.*, 1987). De esta manera, las lipoproteínas VLDL, IDL y LDL se enriquecen en ésteres de colesterol, mientras que las HDL₃ lo hacen en TAG, generándose la subespecie HDL₂ (HDL maduro). CETP es una glicoproteína plasmática de 476 aminoácidos (76 kDa) producida en el hígado y en el tejido adiposo. Su estructura está relacionada con la proteína PLTP, con un 25% de similitud en su secuencia. Las personas que

carecen de este transportador presentan niveles extremadamente altos de HDL₃, produciendo hiperalfalipoproteinemia, quedando los ésteres de colesterol confinados en las HDL, además de provocar un descenso relativo de niveles de LDL en plasma (Inazu *et al.*, 1996).

El colesterol presente en las LDL puede volver a los tejidos periféricos o dirigirse al hígado para su degradación a través de los receptores LDLR. Por otra parte, la degradación de las HDL tiene lugar en el hígado tras su unión con un receptor de membrana SR-B1 (del inglés, *Scavenger Receptor-B1*). Este transporte reverso del colesterol previene la excesiva acumulación de colesterol en el organismo. El metabolismo de las HDL es muy complejo y no se conocen con exactitud todas las transformaciones que sufren estas lipoproteínas ni los factores que la regulan.

El mantenimiento de unos niveles óptimos de LDL es esencial para una función apropiada del organismo. Por esta razón, existen varios mecanismos para regular la concentración en plasma de esta lipoproteína. Esta regulación es muy importante, ya que alteraciones en estas rutas producen la aparición de **dislipidemias**, es decir, un aumento o descenso notable en las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en plasma.

Todas estas alteraciones están directamente relacionadas con afectaciones cardíacas. La aterosclerosis es la más extendida, debido a que las partículas LDL cargadas de colesterol tienden a acumularse en las paredes vasculares donde sufren un proceso de oxidación formando placas de ateroma (Steinberg *et al.*, 1989). Recordemos que estas afectaciones producen un alto porcentaje de muertes en países desarrollados cada año.

5.4. Metabolismo lipídico en insectos

Drosophila toma la mayor parte de los lípidos que requiere de la dieta, aunque también puede sintetizar ácidos grasos y TAG *de novo*. Sin embargo, es auxótrofa para el colesterol (Clayton *et al.*, 1964; Gilbert *et al.*, 2002), el esteroide mayoritario encontrado en insectos, componente estructural de las membranas y precursor de la hormona esteroidea ecdisona (Grieneisen, 1994; Y Svoboda, 1999).

Los enterocitos intestinales absorben los lípidos de la dieta después de ser hidrolizados por enzimas gástricas y una vez procesados los transfieren a lipoproteínas circulantes que a su vez los llevan hasta el cuerpo graso, un tejido con funciones relacionadas con el tejido adiposo de los mamíferos. En este órgano los lípidos se acumulan en forma de inclusiones citoplasmáticas (LD) formadas mayormente por triacilglicérols (TAG) y constituyendo la principal reserva energética a largo plazo del organismo. La aportación de TAG mediante síntesis *de novo* a partir de carbohidratos es mínima en condiciones normales (Beenackers *et al.*, 1985).

Lipoforina

El transporte de lípidos en insectos guarda muchas similitudes con los mecanismos descritos anteriormente para mamíferos. Al igual que en estos, ocurre mediante lipoproteínas que permiten la suspensión de los lípidos en la hemolinfa y su distribución por el cuerpo. La principal lipoproteína en insectos se llama **lipoforina**, estando estructurada mediante una molécula de apolipoforina. Es de destacar que la apolipoforina tiene homología a la ApoB de mamíferos, formando parte de una superfamilia que algunos autores han

llamado “proteínas grandes de transferencia de lípidos” ó LTTP (del inglés, *Large Lipid Transfer Protein*) (Figura 8A) y que también incluye el MTP, una proteína encargada del ensamblaje de ciertas lipoproteínas en el retículo endoplasmático y que posiblemente sea el ancestro evolutivo de la familia (Babin *et al.*, 1999; Mann *et al.*, 1999 y Segrest *et al.*, 2001).

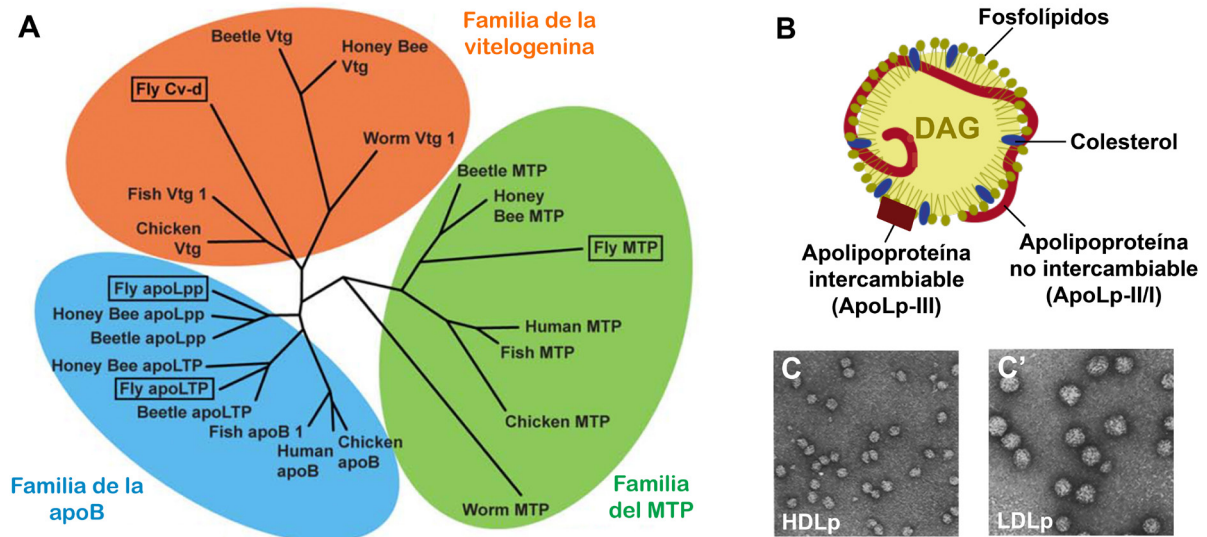


Figura 8. Estructura y composición de las lipoproteínas en insectos. (A) Árbol filogenético de proteínas animales conteniendo el dominio vitelogenina. Todas las proteínas de la familia LTTP presentan el dominio vitelogenina (o LLT) en el extremo N-terminal. Este dominio tiene aproximadamente unos 1000 aminoácidos y es donde tiene lugar la unión a los lípidos y media su transferencia a las apolipoproteínas. (B) Representación de una partícula de lipoforina. El núcleo está compuesto principalmente por diacilglicerol (DAG). Este núcleo está rodeado por una monocapa de fosfolípidos, colesterol y proteínas (apolipoproteínas). (C) Tinción negativa de las lipoproteínas de alta densidad: HDLp y (C') de baja densidad: LDLp purificadas de *Locusta migratoria* x135.000. Tomadas de Palm *et al.*, 2012; Van Antwerpen *et al.*, 1988 y Joaquim Culi.

La lipoforina es una partícula esférica de entre 450-600 kDa, cuya superficie la componen fosfolípidos y proteínas (Figura 8B). Suele encontrarse en forma de lipoproteína de alta densidad (HDLp), entorno a 1,13-1,14 mg/ml (Figura 8C). A diferencia de las lipoproteínas de mamíferos, la lipoforina suele transportar lípidos neutros en forma de 1,2-diacilglicerol (DAG) en la mayoría de insectos (Shapiro *et al.*, 1988), por lo que el TAG debe sufrir un proceso de deacetilación previo a su transferencia a las lipoforinas (Van der Horst *et al.*, 2009). La proporción de DAG varía entre especies y durante el desarrollo del animal. Por ejemplo, las lipoforinas de algunos dípteros como el mosquito de la fiebre amarilla *Aedes aegypti*, transportan principalmente TAG (Ford and Van Heusden, 1994). Además de DAG, la lipoforina también contiene fosfolípidos (preferentemente fosfatidiletanolamina, PE), esteroides, y otros componentes hidrofóbicos como carotenoides, hidrocarburos, hormona juvenil y feromonas (Chino and Kitazawa, 1981; Van der Horst and Ryan, 2004; Gu *et al.*, 1995; Schal *et al.*, 1998a,b; Sevala *et al.*, 1997). El contenido de hidrocarburos es alto en algunas especies como la cucaracha *Periplaneta americana* y la langosta *Locusta migratoria*, ya que son usados para la formación de la cutícula. (Chino and Kitazawa, 1981). En *Drosophila*, organismo utilizado en esta tesis, los lípidos más abundantes de la lipoforina son DAG (70 mol%) y fosfatidiletanolamina (PE) (20 mol%) y en menor proporción, esteroides 5 mol%, incluyendo TAG, fosfatidilcolina (PC), ceramida y ceramida-fosforiletanolamina (Palm *et al.*, 2012).

La lipoforina se sintetiza en el retículo endoplasmático del cuerpo graso (Locke, 1998). Cada partícula presenta una copia de dos apolipoproteínas no intercambiables: Apolipoforina-I (ApoLp-I) y Apolipoforina-II (ApoLp-II) de aproximadamente 250 kDa y 70 kDa, respectivamente. ApoLp-I y ApoLp-II provienen de la escisión post-traducciona de un precursor común. La escisión ocurre en un sitio consenso RxRR y es realizada por una furina localizada en la red trans-golgi (TGN), si bien esta escisión no parece ser esencial para la síntesis o secreción de la lipoforina madura (Smolenaars *et al.*, 2007). La formación de las partículas de lipoforina se inicia en el retículo endoplasmático. En éste, ocurre un proceso de lipidación de ApoLp que requiere de MTP (al igual que en mamíferos) durante el cual lípidos sintetizados en el retículo endoplasmático son incorporados a la ApoLp iniciando así la formación de partículas nacientes de lipoforina, ya solubles (Smolenaars *et al.*, 2005).

Una característica fundamental de la lipoforina es que actúa como un transportador de lípidos reutilizable, el cual se carga y descarga de lípidos en diferentes tejidos diana sin que se degrade la apolipoforina (Figura 9). Esto se ha visto en experimentos en los que se marcaba con radioisotopos distintos la parte proteica y lipídica de la lipoforina. Con el paso del tiempo, la marca de los lípidos desaparecía, (de 43 a 94 minutos, dependiendo del lípido marcado) indicando su transferencia a tejidos o su metabolización, mientras que la de la proteína permanecía inalterada por periodos de días (~30 horas). (Law *et al.*, 1992; Ryan, 1990; Van der Horst, 1990).

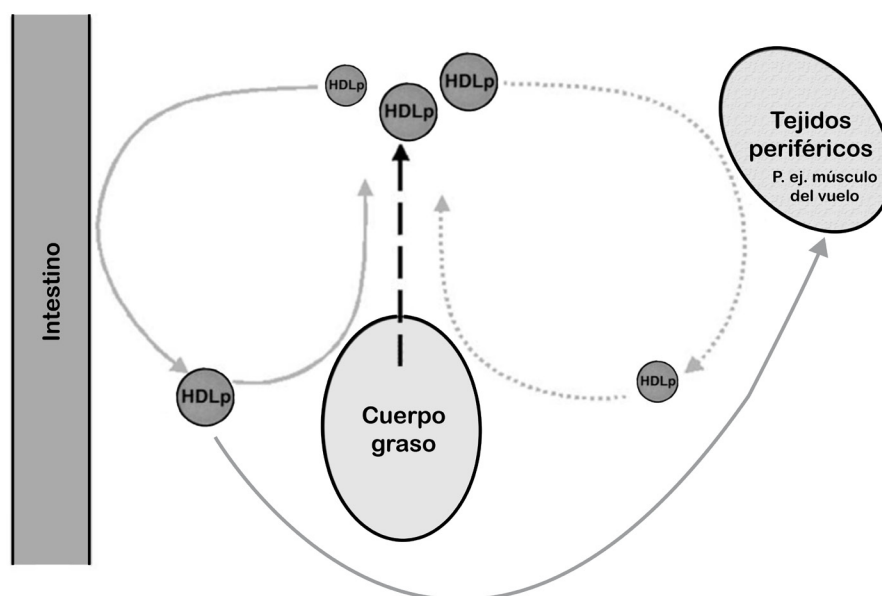


Figura 9. Esquema mostrando el transporte de lípidos en insectos mediante la lipoforina. Por un lado, la lipoforina (HDLp) se puede cargar con lípidos ya sea en el intestino (flecha continua) o en el cuerpo graso (línea de puntos). Por otro lado, la lipoforina cede sus lípidos al interactuar con tejidos periféricos (línea de puntos). Por último, la flecha discontinua representa la biosíntesis y secreción de la lipoproteína en el cuerpo graso. Modificada de Rodenburg and Van der Horst, 2005.

Por ejemplo, un ciclo de funcionamiento de la lipoforina consiste en cargarse de lípidos en el cuerpo graso y cederlos a los músculos, principalmente el músculo del vuelo, que tiene un alto requerimiento energético. Esto se ha estudiado detalladamente en especies que realizan vuelos migratorios como *Locusta migratoria* y *Manduca sexta*. El vuelo prolongado promueve

la liberación de la hormona adipocinética (AKH), similar al glucagón en mamíferos. Ésta actúa sobre las células del cuerpo graso para estimular la conversión del TAG acumulado a DAG, y su transferencia a la lipoforina, que baja de densidad (LDLp) (Figura 8C'). Estas partículas de lipoforinas muy ricas en lípidos y de gran tamaño, requieren de la incorporación de moléculas de ApoLp-III, otra apolipoproteína específica de estas especies, para mantener su estabilidad. Esta ApoLp-III proviene de la hemolinfa, donde se encuentra en abundancia como proteína libre especialmente en condiciones de reposo. Una vez que llega la lipoproteína cargada de lípidos a la superficie del músculo, se produce la hidrólisis de DAG a ácidos grasos libres (FFA, del inglés *Free Fatty Acids*), posiblemente mediante la acción de una lipasa todavía no identificada. De esta manera la lipoforina pierde lípidos y volumen y de forma acorde, también se liberan moléculas de ApoLp-III de su superficie que pueden ser reusadas en otro ciclo (Van Heusden *et al.*, 1991). ApoLp-III no existe en *Drosophila* (Palm *et al.*, 2012).

La función de la lipoforina no se ha empezado a estudiar genéticamente hasta hace poco. Su falta de función en *Drosophila* produce un aumento en la acumulación de lípidos en tejidos productores como el intestino, así como su reducción en tejidos diana como por ejemplo los discos imaginales (Panáková *et al.*, 2005). Asimismo, los mutantes de *apoLp* mueren durante la fase embrionaria, debido a fallos en la movilización de las reservas de lípidos de aporte materno (Palm *et al.*, 2012). Estudios genéticos han mostrado también funciones de la lipoforina no directamente relacionadas con el metabolismo de lípidos. Así, se vio que la lipoforina desempeña una función fundamental modulando el transporte y actividad de los morfógenos lipofílicos Wingless y Hedgehog, responsables de la formación del patrón en diversos tejidos (Callejo *et al.*, 2008; Panáková *et al.*, 2005).

LTP (*Lipid Transfer Particle*)

En 1986 se purificó por primera vez de la hemolinfa de larvas de *Manduca sexta* una lipoproteína distinta a la lipoforina denominada LTP (del inglés, *Lipid Transfer Particle*) atendiendo a su capacidad de facilitar la redistribución de lípidos entre lipoforinas de distintas densidades *in vitro* (Ryan *et al.*, 1986a, 1986b). Es una lipoproteína de muy alta densidad (1,23 mg/ml) y de gran tamaño, con una masa molecular de más de 670 kDa (Ryan *et al.*, 1988a). Esto ha permitido que pueda examinarse su estructura mediante microscopía electrónica de tinción negativa en la que se muestra como el LTP tiene una estructura asimétrica que consta de 3 partes bien diferenciadas: una cabeza esférica donde se localizan principalmente los lípidos, una cola cilíndrica elongada y un giro (*hinge*) de entre 30-180° aproximadamente situada a la mitad de esta cola (Ryan *et al.*, 1990a; Takeuchi and Chino, 1993) (Figura 10).

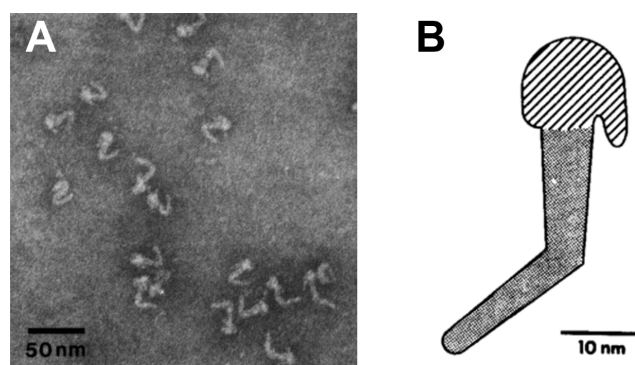


Figura 10. Morfología del LTP. (A) Imagen de microscopía electrónica de tinción negativa del LTP procedente de la hemolinfa de prepupas del quinto estadio de *Manduca sexta*. (B) Representación de su morfología. Tomada de Ryan *et al.*, 1990a.

Al igual que la lipoforina, su precursor se sintetiza en el retículo endoplasmático del cuerpo graso y requiere de la acción de MTP. Posteriormente es secretado a la hemolinfa (Van Heusden *et al.*, 1996 y Palm *et al.*, 2012). En insectos como *Locusta migratoria* o *Manduca sexta* (Blacklock and Ryan, 1994), el LTP está compuesto por un complejo de 3 apolipoproteínas: ApoLTP-I (~320 kDa), ApoLTP-II (~85 kDa) y ApoLTP-III (~55 kDa). ApoLTP-I y ApoLTP-II se generan a partir de un precursor que sufre un procesamiento en el extremo C-terminal del dominio vitelogenina por una furina, mientras que ApoLTP-III corresponde a otro gen. En *Drosophila*, también hay ApoLTP-I y ApoLTP-II y además, se han encontrado mediante BLAST tres posibles homólogos de ApoLTP-III. Sin embargo, se desconoce si forman parte de la partícula de LTP (Palm *et al.*, 2012).

El LTP ha sido identificado y purificado de la hemolinfa en una amplia variedad de insectos incluyendo *Locusta migratoria* (Hirayama and Chino, 1990), *Musca domestica* (Capurro and de Bianchi, 1990), *Periplaneta americana* (Takeuchi and Chino, 1993), *Bombyx mori* (Tsuchida *et al.*, 1997), *Rhodnius prolixus* (Golodne *et al.*, 2001) y *Drosophila melanogaster* (Palm *et al.*, 2012), indicando que el LTP podría estar presente en todos los insectos. En todos los casos la función del LTP es similar, el tamaño de las ApoLTP parecido y sus secuencias, en las especies en las que está disponible, homólogas. Su contenido lipídico es también similar (14-21%) (ver Tabla 2). El LTP de la cucaracha *Periplaneta americana* presenta un porcentaje mayor de hidrocarburos comparado con el resto, siendo el más predominante junto con los fosfolípidos. Por el contrario, el contenido de fosfolípidos del LTP de *Locusta migratoria* es considerablemente menor y el LTP de *Bombyx mori* parece ser el único que presenta monoacilglicerol (MAG). En *Drosophila* es difícil saber la composición de lípidos del LTP debido a su baja abundancia en la hemolinfa. Sin embargo, se ha observado que las fracciones de hemolinfa separadas por ultracentrifugación que se corresponden a esa lipoproteína están enriquecidas en esfingolípidos con ácidos grasos hidroxilados (Palm *et al.*, 2012).

Tabla 2. Comparación de la composición y masa del LTP en distintos insectos

Fracción	<i>M. sexta</i> ^a	<i>L. migratoria</i> ^b	<i>P. americana</i> ^c	<i>B. mori</i> ^d
Proteína (% masa)	81	86	79	79
Apoproteínas (M_r)				
ApoLTP-I	320 000	310 000	310 000	350 000
ApoLTP-II	85 000	89 000	94 000	85 000
ApoLTP-III	55 000	68 000	61 000	60 000
Lípidos totales (% masa)	14	14	21	21
Lípidos (% peso)	58	18	57	54.5
fosfolípidos				
Monoacilglicerol	nd	nd	nd	8.3
Diacilglicerol	28	44	2	17.0
Ácidos grasos	8	13	nd	14.3
Triacilglicerol	6	nd	nd	5.5
Hidrocarburos	nd	17	40	0.4
esteroles	nd	8	trazas	nd

nd, no detectado, ^a Ryan *et al.*, 1988a, ^b Hirayama and Chino, 1990, ^c Takeuchi and Chino, 1993, ^d Tsuchida *et al.*, 1996

Estudios *in vitro* han mostrado como el LTP promueve el intercambio y transferencia neta de lípidos entre lipoforinas de diferentes densidades y estadios del desarrollo (Ryan *et al.*, 1986a,b, 1988a; Capurro and de Bianchi, 1990; Ryan *et al.*, 1990b; Hirayama and Chino, 1990; Takeuchi and Chino, 1993). Esta función también es capaz de realizarla entre lipoforinas procedentes de distintos insectos (Ryan *et al.*, 1988b; Capurro and de Bianchi, 1990 y Takeuchi and Chino, 1993), así como entre la lipoforina y las lipoproteínas humanas LDL (Figura 11) (Ryan *et al.*, 1990c; Ando *et al.*, 1990 y Singh *et al.*, 1992) o HDL (Ando *et al.*, 1990 y Ryan *et al.*, 1992), e incluso en microemulsiones lipídicas (Ando *et al.*, 1990). Por ejemplo, en Ryan *et al.*, 1990, se mostró como al incubar la lipoforina larvaria marcada con DAG tritiado [^3H -DAG]-HDLp junto con LDL humano y LTP purificado de la hemolinfa, se producía la transferencia neta de DAG desde HDLp hacia LDL humano, pero no así el intercambio o transferencia de las apolipoproteínas (Ver Figura 11). Todo ello sugiere que el LTP podría alterar el contenido lipídico de las lipoforinas *in vivo*. Además, es capaz de transferir un amplio rango de lípidos, entre ellos se encuentran los DAG (Ryan *et al.*, 1988a,b; Ryan *et al.*, 1990b,c; Singh *et al.*, 1992), fosfolípidos (PL) (Ando *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 1992; Tsuchida *et al.*, 1997), TAG (Ando *et al.*, 1990), hidrocarburos (Singh and Ryan, 1991; Takeuchi and Chino, 1993) y carotenoides (Tsuchida *et al.*, 1998). Esto hace pensar que el LTP podría cumplir la función conjunta de los transportadores CETP y PLTP de mamíferos.

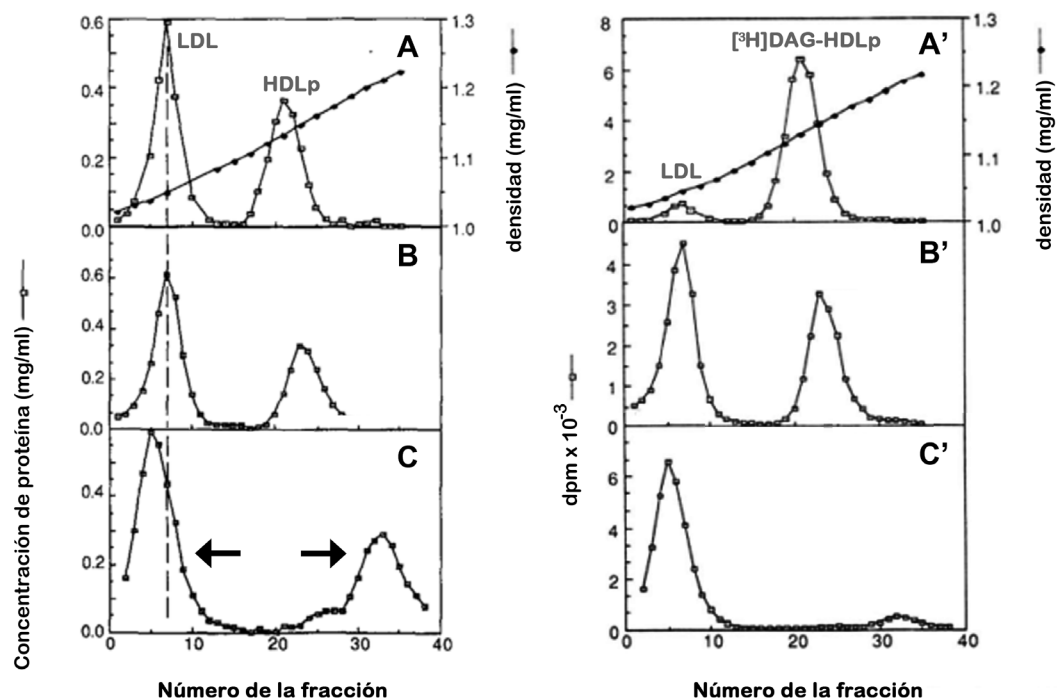


Figura 11. El LTP de *Manduca sexta* cataliza la transferencia de DAG entre la lipoforina y la lipoproteína humana LDL. HDLp larvaria y LDL (A-C) o [^3H]DAG-HDLp larvaria y LDL (A'-C') fueron incubadas a distintos tiempos en presencia o ausencia del LTP. (A, A') Incubación control de 120 min, ausencia de LTP; (B, B') En presencia de 5 µg de LTP, se observa como las densidades de las lipoproteínas se modifican y se produce el intercambio de lípidos marcados; (C, C') Al aumentar la concentración del LTP y el tiempo de incubación, se aprecia como la lipoproteína LDL disminuye su densidad a la vez que la HDLp la aumenta (C, flechas), debido a que los lípidos se han transferido desde la HDLp hacia LDL (C'). Tomada y modificada de Ryan *et al.*, 1990c.

Otros estudios realizados en condiciones más cercanas a las fisiológicas han examinado el papel del LTP en la transferencia de lípidos entre tejidos y la lipoforina. Por ejemplo, tejidos tales como el cuerpo graso (tanto adulto como larvario) o sacos del intestino medio de *Manduca sexta* conteniendo lípidos marcados, se incubaron con lipoforina purificada (HDLp), y se observó una transferencia de lípidos hacia la lipoforina dependiente del LTP, ya que esta actividad se inhibía casi totalmente al tratar los tejidos con un anticuerpo específico contra ApoLTP (α -LTP). Además, esta actividad se restablecía al añadir LTP purificado de la hemolinfa (Van Heusden and Law, 1989; Canavoso *et al.*, 2001, 2004). Hay que resaltar que se observó bidireccionalidad del proceso de transferencia de lípidos en el caso del cuerpo graso larvario y la lipoforina (Canavoso *et al.*, 2004). Estos experimentos llevaron a algunos autores a proponer que la función fisiológica del LTP sería promover la transferencia de lípidos desde el cuerpo graso a lipoforinas circulantes de alta densidad (HDLp) formándose lipoforinas de baja densidad (LDLp) en condiciones de alto requerimiento energético, como por ejemplo durante el vuelo. Estas LDLp cederían su contenido lipídico a tejidos periféricos como el músculo del vuelo (Van Heusden and Law, 1989).

Se ha propuesto que el LTP también participa en la acumulación de lípidos en el huevo que ocurre durante la vitelogénesis. Se vio que los oocitos de *M. sexta* contienen LTP con capacidad de promover el intercambio de lípidos. En este caso, se prepararon extractos de ovarios que habían sido tripsinizados previa a su homogenización para eliminar el LTP que pudiera estar asociado a las superficies celulares. Estos extractos de ovarios promovían la transferencia de lípidos desde HDLp al LDL humano, produciendo lipoforinas de muy alta densidad (VHDLp). En este trabajo concluían que existe una fracción de LTP que se encuentra dentro de los oocitos. La función de este LTP podría consistir en mediar la extracción de lípidos de las HDLp endocitadas por el oocito para su almacenaje en el huevo y su transformación a VHDLp, que también se acumula dentro del oocito (Liu and Ryan, 1991). Esta transferencia de DAG desde la lipoforina hacia ovariolas también fue observada en *Bombyx mori* (Jouni *et al.*, 2003).

El mecanismo de acción del LTP se ha comparado con la proteína de transferencia de ésteres de colesterol humana o CETP, que recordemos que permite el intercambio tanto de ésteres de colesterol como de TAG entre distintas lipoproteínas formando un complejo ternario entre ellos (Charles and Kane, 2012). En este sentido, ha habido cierta controversia a la hora de determinar si el LTP forma un complejo ternario entre el donador y el aceptor o si actúa como intermediario entre ambas partículas. Para solventar este asunto se realizaron una serie de experimentos *in vitro* en *Manduca sexta* donde las lipoproteínas donadoras y el aceptores de lípidos estaban físicamente separadas. Cada tipo de lipoforina estaba unida covalentemente a una matriz de sefarosa en columnas distintas pero conectadas en serie, entre las cuales se hacía circular tampón con o sin LTP (como control) (Blacklock *et al.*, 1992). En la primera columna se fijó la lipoforina con lípidos tritiados [3 H-DAG]-HDLp y en la segunda el aceptor, la partícula LDL humana. Cuando circulaba entre ellas el tampón con concentraciones crecientes de LTP, se observó como esta lipoproteína era capaz de transferir los lípidos desde el donador hasta el aceptor LDL. Esta transferencia no tenía lugar con tampón sin LTP (Blacklock *et al.*, 1992). Todos los resultados obtenidos dieron lugar a la misma conclusión, la transferencia de lípidos entre el donador y el aceptor mediante el LTP no requería la formación de un complejo ternario. Por lo tanto, **el LTP actúa como intermediario entre ambas partículas**. Para complementar el mecanismo de acción, se realizaron estudios específicos de inhibición con diferentes anticuerpos. En ellos se pudo concluir que tanto ApoLTP-I como ApoLTP-II son importantes para la función catalítica del LTP (Blacklock and Ryan, 1995; Van Heusden *et al.*, 1996).

Como esta tesis está centrada en el metabolismo lipídico de *Drosophila melanogaster*, vamos a exponer algunos estudios sobre el LTP en este organismo modelo con mayor profundidad. En Palm *et al.*, 2012, se purificaron las distintas lipoproteínas presentes en la hemolinfa de larvas de *Drosophila*. Además de la ya conocida lipoforina, se identificó el LTP y crossveinless d (cv-d) (Figura 12A). El LTP de *Drosophila* tiene una densidad parecida al LTP del resto de insectos (~1,23 mg/ml) y su cantidad en la hemolinfa es hasta 10 veces menor con respecto a la lipoforina (Figura 12B).

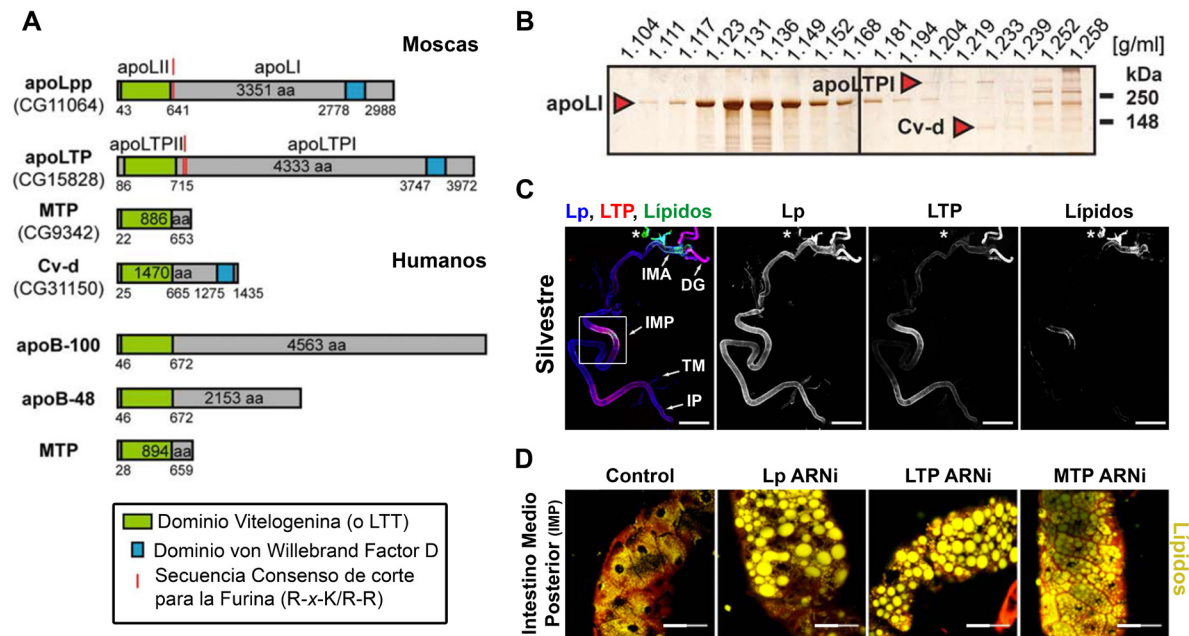


Figura 12. Fenotipo de falta de función del LTP en *Drosophila melanogaster*. (A) Representación de las proteínas de moscas y humanos conteniendo el dominio vitelogenina (marcado en verde). En *Drosophila* existen dos homólogos de la ApoB: ApoLpp y ApoLTP, además de MTP y cv-d más divergentes. En humanos, sólo existe un gen *apoB* que da lugar a ApoB-100 y ApoB-48, y un gen para MTP. Tanto ApoLpp como ApoLTP, sufren un procesamiento por una furina que da lugar a dos polipéptidos denominados ApoLpp-I, ApoLpp-II, y ApoLTP-I, ApoLTP-II, respectivamente (marcas rojas). Los números en el interior de las cajas definen el número de aminoácidos (aa) totales predicho para ese polipéptido. Los números debajo de las cajas definen los aminoácidos correspondientes a cada dominio marcado. (B) Tinción de plata de un gel mostrando las lipoproteínas de la hemolinfa de larvas en el tercer estadio del desarrollo después de ser fraccionadas por gradiente de KBr. (C) Inmunotinción del intestino procedente de larvas silvestres en segundo estadio larvario. La lipoforina (Lp) está marcada en azul, el LTP en rojo y los lípidos en verde (Nile red). El asterisco señala un fragmento de cuerpo graso, DG: divertículos gástricos, IMA: intestino medio anterior, IMP: intestino medio posterior, TM: túbulos de Malpighi e IP: intestino posterior. Barra de escala: 200 μ m. (D) Inclusiones lipídicas de la región posterior del intestino medio (IMP) bajo el silenciamiento por ARNi de *apoLp*, *apoLTP* y *apoMTP*. Los lípidos están marcados con Nile red en amarillo. Barra de escala: 50 μ m. Imágenes tomadas y modificadas de Palm *et al.*, 2012.

Tanto la Apolipoforina como la ApoLTP son homólogas de ApoB de mamíferos. En mamíferos las lipoproteínas se sintetizan tanto en el hígado como en el intestino. Sin embargo, en

Drosophila y *Manduca sexta*, se ha demostrado que el LTP se sintetiza en el cuerpo graso de manera dependiente del MTP, pero no en el intestino (Palm *et al.*, 2012 y Van Heusden *et al.*, 1996). No obstante, tal y como se muestra en la Figura 12C, el LTP está presente en el intestino, mayoritariamente en el intestino medio posterior (IMP) y los divertículos gástricos (DG), regiones donde tiene lugar una mayor acumulación de lípidos. En Panáková *et al.*, 2005 se observó como el silenciamiento del gen de la *apolipoforina* por ARN interferente producía una acumulación de inclusiones lipídicas en el intestino. De forma similar, al bloquear la función de MTP o de *apoLTP* mediante ARN interferente, se producían fenotipos similares consistentes en un aumento en el tamaño y número de las inclusiones lipídicas en el intestino medio y más moderadamente en los divertículos gástricos, revelando el posible papel del LTP en el metabolismo lipídico (Figura 12D).

Con respecto a su función fisiológica, en Palm *et al.*, 2012, observaron que al igual que en *Manduca sexta* (Canavoso *et al.*, 2001), el LTP de *Drosophila melanogaster* facilitaba la transferencia de lípidos desde el intestino a la lipoforina circulante. En estos experimentos, estudiaron el contenido lipídico de las lipoforinas tras incubar *in vitro* intestinos procedentes de larvas deficientes para LTP ya sea con hemolinfa obtenida de larvas silvestres o de larvas deficientes para el LTP. Como el contenido lipídico de las lipoforinas procedentes de larvas deficientes para LTP es bajo, utilizaron como control larvas silvestres mantenidas en ayunas, que igualmente muestran lipoforinas de bajo contenido lipídico. Se observó como sólo en el primer caso disminuía la densidad de las lipoforinas debido a la incorporación de lípidos desde el intestino, indicando la necesidad del LTP para este proceso. Respecto al mecanismo de acción del LTP, vieron que éste debía de ser internalizado mediante endocitosis para que la movilización de los lípidos en los enterocitos tuviera lugar. Al inhibir la endocitosis en el intestino mediante la expresión de una forma de la dinamina dominante negativa, se observó como las inclusiones lipídicas aumentaron de tamaño, al igual que ocurre al bloquear la lipoforina o el LTP de forma sistémica. Esto, junto con el hecho que el LTP se detecta en el interior de los enterocitos por inmunofluorescencia, sugiere que la endocitosis del LTP es necesaria para la transferencia de lípidos desde el intestino a la lipoforina circulante. Sorprendentemente, la lipoforina nunca se observa en el interior de los enterocitos.

En resumen, estos trabajos han mostrado que tanto el LTP como la lipoforina se sintetizan en el cuerpo graso y para ello requieren de MTP, una proteína del retículo endoplasmático con funciones de chaperona. Posteriormente, lipoforina y LTP son secretados a la hemolinfa. En el intestino, se produce la endocitosis del LTP, mientras que la lipoforina se localiza en la superficie de los enterocitos. Por un mecanismo no aclarado, la lipoforina se carga de lípidos mediante un proceso dependiente de LTP. Algo parecido podría ocurrir en el cuerpo graso en condiciones que inducen la movilización de lípidos. Esta lipoforina cargada es transportada hacia otros tejidos periféricos donde puede ceder su carga lipídica en un proceso que también podría requerir del LTP.

Es importante resaltar el recientemente descubierto papel del LTP en el sistema nervioso de *Drosophila*. En este caso el LTP actúa como un intermediario que informa al cerebro del estado nutricional del organismo, en particular, de la entrada de lípidos durante la ingesta. El LTP puede atravesar la barrera hematoencefálica gracias a los receptores LRP1 y Megalin que median su transcitosis. Posteriormente, se ha visto que se acumula en varias neuronas que establecen sinapsis con células neurosecretoras productoras de péptidos similares a la insulina (ILPs), induciendo su liberación a la hemolinfa de forma dependiente de la dieta (Brankatschk *et al.*, 2014).

Receptores de lipoforinas

Los receptores de lipoforinas son ortólogos a los receptores LDLR de mamíferos. En estudios clásicos se observó la capacidad de estos receptores para internalizar partículas de lipoforina mediante endocitosis en el cuerpo graso de *Manduca sexta* y en células de mamífero en cultivo transfectadas con estos receptores (Tsuchida and Wells, 1990; Dantuma *et al.*, 1999, respectivamente). Posteriormente, estos receptores fueron caracterizados molecularmente en otros insectos como por ejemplo, *Aedes aegypti* (Cheon *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2003), *Galleria mellonella* (Lee *et al.*, 2003a,b), *Bombyx mori* (Gopalapillai *et al.*, 2006), *Blatella germanica* (Ciudad *et al.*, 2007), *Apis mellifera* (Guidugli *et al.*, 2008) y *Leucophaea maderae* (Tufail *et al.*, 2009).

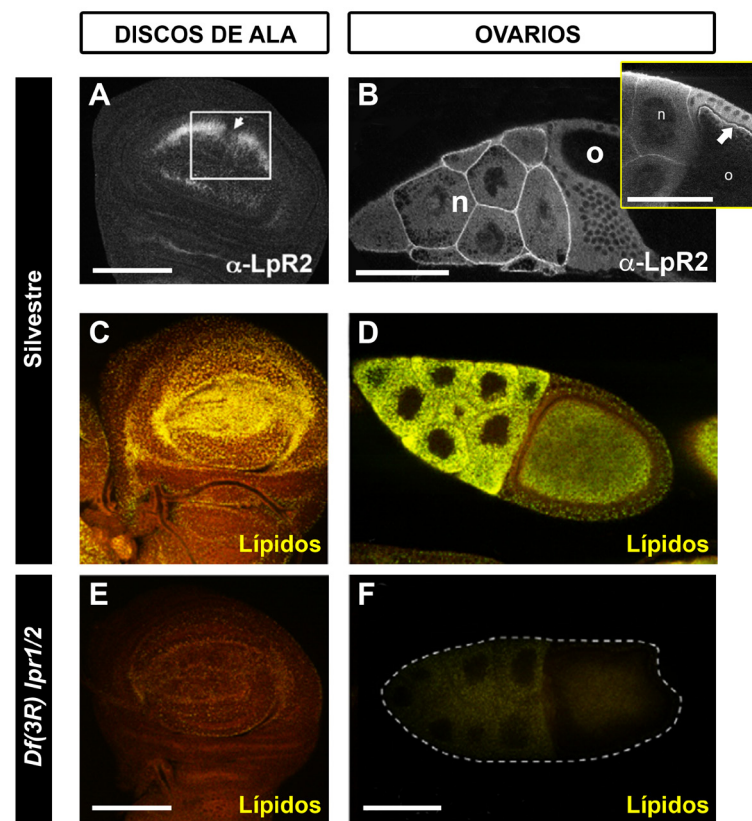


Figura 13. Patrón de expresión de los receptores de lipoforinas y su implicación en la toma de lípidos. La distribución del receptor se muestra en gris mediante el anticuerpo específico α -Lpr2 en discos imaginales de ala (A) y ovarios (B) silvestres. En los ovarios, Lpr2 se acumula en las membranas de las células nutricias (n) y del oocito (o) (recuadro amarillo, flecha) del estadio 11 y 10 respectivamente. (C-D) Acumulación de lípidos neutros en amarillo marcados con Nile red en la región que da lugar al ala adulta en discos imaginales de ala silvestre (C) y en la cámara del huevo en estadio 10 de ovarios silvestres (D). La falta de función de ambos receptores Lpr1 y Lpr2, en discos imaginales (E) y ovarios (F) muestra como el contenido lipídico disminuye drásticamente. Barras de escala: 100 μ m. Tomadas y modificadas de Parra-Peralbo and Culi, 2011.

En *Drosophila melanogaster* se identificaron dos genes con una alta homología a los receptores LDLR, el *lipophorin receptor 1* (*lpr1*) y el *lipophorin receptor 2* (*lpr2*). Estos receptores se expresan

en tejidos que acumulan gran cantidad de lípidos. Entre ellos destacan los discos imaginales de ala expresándose en la zona que da lugar al ala adulta (Figura 13A), y en ovarios donde se acumula en las membranas de las células nutricias y del oocito (Figura 13B). En el ovario empiezan a detectarse en el estadio 8 coincidiendo con el comienzo de la vitelogénesis, siendo máxima su expresión en el estadio 10.

Los receptores de lipoforinas son esenciales para la toma de lípidos en ovarios y discos imaginales de ala, ya que en tejidos mutantes para estos receptores (*Df(3R)lpr1/lpr2*) se aprecia una fuerte disminución de la acumulación de inclusiones lipídicas intracelulares (Figura 13 Comparar C-D con E-F). Si bien estas moscas doble mutantes son viables en homocigosis, las hembras adultas presentan un fenotipo de esterilidad debido a la atrofia de los ovarios (Parra-Peralbo and Culi, 2011).

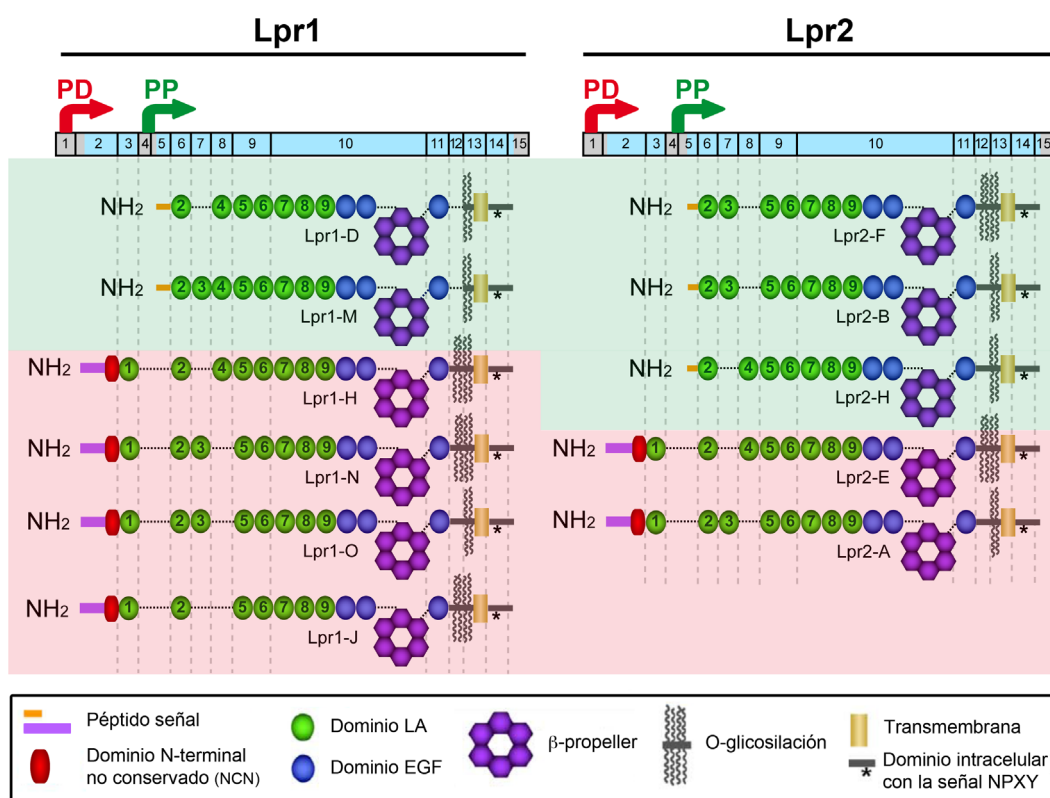


Figura 14. Los receptores de lipoforinas codifican múltiples isoformas generadas por el uso de dos promotores diferentes y por *splicing* alternativo. Estructura modular de las distintas isoformas de *lpr1* y *lpr2*, mostrando la correspondencia entre dominios proteicos y exones (rectángulo azul arriba). Las regiones UTR están marcadas en gris. Las isoformas transcritas desde el PD y PP están resaltadas en rojo y verde respectivamente. Tomada y modificada de Parra-Peralbo and Culi, 2011.

En *Drosophila*, *lpr1* y *lpr2* tienen una disposición en tándem en el tercer cromosoma. Ambos genes tienen 15 exones que están organizados de forma similar (Figura 14), de manera que los exones que ocupan posiciones equivalentes codifican para los mismos dominios proteicos. Asimismo, existen dos promotores distintos para cada gen, un promotor proximal (PP) y un promotor distal (PD), refiriéndose a su posición relativa con el centrómero del cromosoma. Estos genes generan múltiples isoformas dependiendo del promotor utilizado y de eventos de

splicing alternativo. Las isoformas se diferencian entre ellas en tres características fundamentales: la primera de ellas es el número e identidad de los dominios LA, que definen su función; la segunda es la presencia de una mayor o menor región de O-glicosilación próxima al dominio transmembrana, que también ocurre en otras especies como por ejemplo, *Aedes aegypti* (Seo *et al.*, 2003a), *Bombyx mori* (Gopalapillai *et al.*, 2006) y *Blatella germanica* (Ciudad *et al.*, 2007), y la tercera es la presencia de un dominio N-terminal sin homología con otras proteínas o dominios. Mediante experimentos de rescate, en los que se sobre-expresaron las distintas isoformas así como quimeras artificiales generadas a partir de estas isoformas, en una región concreta del disco imaginal de ala o en los ovarios y en fondo mutante para ambos receptores (*Df(3R)lpr1/2*), se estableció que sólo las isoformas de *lpr1* y *lpr2* transcritas desde promotor distal son capaces de mediar la toma de lípidos. Asimismo, se determinó que **el dominio LA1 era crítico para que la adquisición de lípidos tuviera lugar** (Figura 15). Este dato es muy relevante para el desarrollo de esta tesis doctoral.

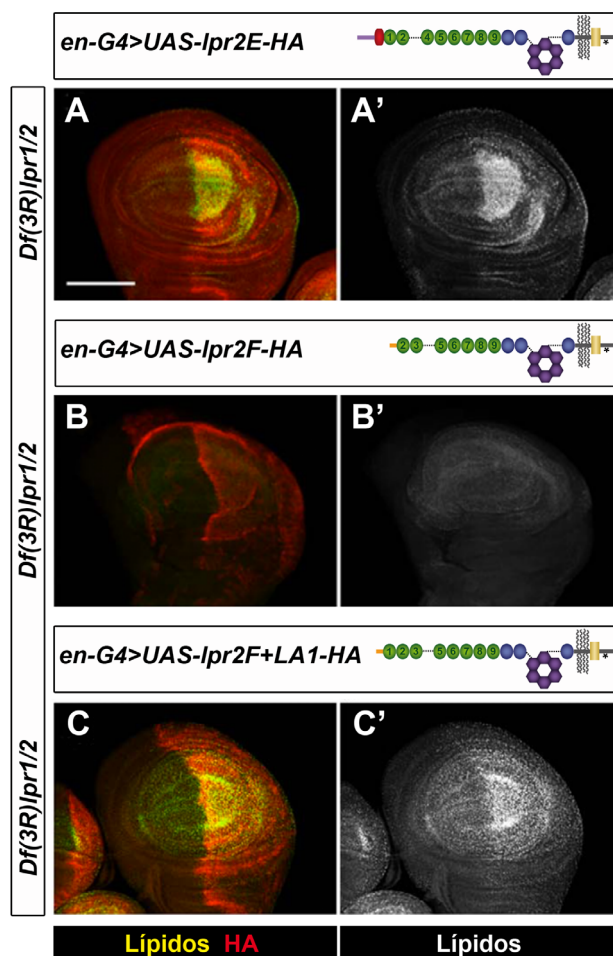


Figura 15. El dominio LA1 es esencial para la toma de lípidos. (A-C) Expresión de los receptores de lipoforinas en el compartimento posterior de discos de ala mutantes para *lpr1* y *lpr2*. Los lípidos neutros se muestran en verde y en un canal desglosado, en gris. (A) *UAS-lpr2E* (B) *UAS-lpr2F* y (C) *UAS-lpr2F+LA1*. La adición del dominio LA1 a la isoforma *Lpr2F* es suficiente para que obtenga la capacidad de mediar la toma de lípidos. Barra de escala: 100 μ m. Tomada y modificada de Parra-Peralbo and Culi, 2011.

En *Drosophila* la toma de lípidos es un proceso independiente de la endocitosis. Así, al bloquear la endocitosis generando clones en la línea germinal de mutantes nulos de Rab5, un importante mediador de las vesículas endocíticas tempranas, las cámaras del huevo mostraron una acumulación normal de inclusiones lipídicas intracelulares tanto en el oocito como en las células nutricias (Figura 16A y B).

El modelo actual para la función de los receptores de lipoforinas propone que éstos estimulan la toma de lípidos actuando a nivel extracelular (Parra-Peralbo and Culi, 2011),

de forma semejante a como se ha descrito para la toma de lípidos neutros en el endotelio vascular de mamíferos y que hemos discutido en apartados previos (Dallinga-Thie *et al.*, 2010). Esta hipótesis se apoya en el hecho de que, como hemos comentado, no se requiere de la endocitosis, y por otro lado, se vio que los receptores de lipoforinas tenían un efecto no autónomo celular. Es decir, al expresar los receptores en discos imaginales de ala o en la línea germinal de ovarios en fondo mutante (*Df(3R)lpr1/lpr2*), se observó como la acumulación de inclusiones lipídicas tuvo lugar no sólo en las células que expresaban los receptores, sino también en las células adyacentes que no lo expresaban (Figura 16C y D).

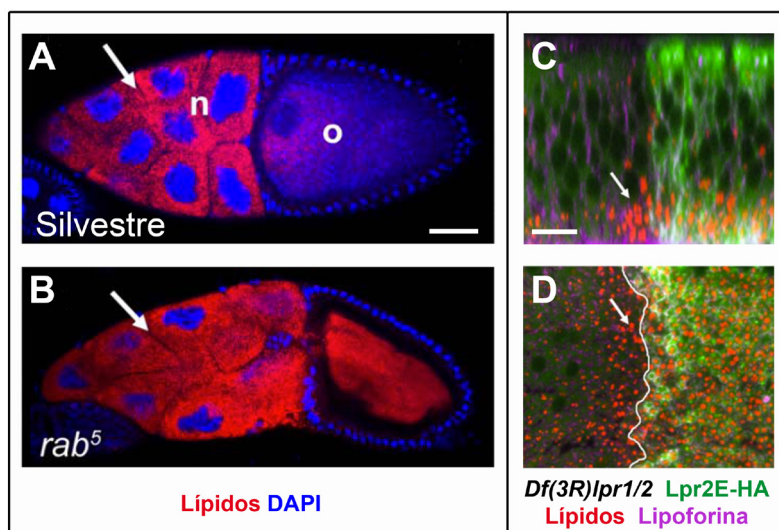


Figura 16. El proceso de adquisición de lípidos en *Drosophila* es independiente de endocitosis. (A) Cámara del huevo en estadio 10 de fenotipo silvestre. Los lípidos están marcados en rojo mediante Nile red y los núcleos en azul con DAPI. Obsérvese la acumulación de lípidos (flecha) en las células nutricias (n) y la autofluorescencia de las proteína Yolk en el oocito (o) en azul. (B) Cámara del huevo cuya línea germinal es mutante para *rab5*. Los lípidos neutros (flecha) se acumulan en las células nutricias de manera similar a como ocurre con el genotipo silvestre. Por el contrario, las proteínas Yolk no están presentes en el oocito, confirmando que la endocitosis está bloqueada en fondo mutante en *rab5*. (C-D) Expresión ectópica de Lpr2E en el compartimento posterior del disco imaginal de ala *Df(3R)lpr1/2*, mediante *en-Gal4*. La distribución de Lpr2E fue detectada con α -HA y se muestra en verde. La distribución de las lipoforinas se muestra en magenta, marcando los contornos celulares. (C) Sección transversal del disco con la parte apical arriba y la basal abajo. Los lípidos neutros (rojo) se detectaron con Nile red. (D) Una sección basal del mismo disco. Nótese que las células que expresan Lpr2E y también dos filas de células adyacentes que no lo expresan, acumulan altos niveles de inclusiones lipídicas localizadas en un plano basal. Una línea blanca indica el límite de expresión de Lpr2E. Observándose que el proceso de adquisición de lípidos celular llevado a cabo por los receptores es por un efecto no autónomo. Barras de escala: 100 μ m (A-C) 10 μ m (D). Tomadas y modificadas de Parra-Peralbo and Culi, 2011.

Finalmente, es importante destacar que las isoformas transcritas desde el promotor distal tienen péptidos señal atípicamente largos (68 y 88 aminoácidos para *lpr1* y *lpr2*, respectivamente) comparados con los transcritos desde el promotor proximal de 20 (*lpr1*) y 24 (*lpr2*) aminoácidos. Como en esta tesis doctoral vamos a prestar especial atención al papel de los péptidos señal de los receptores de lipoforinas, a continuación introducimos su estructura y función.

6. Estructura de los péptidos señal y sus funciones

El péptido señal (SP) es una secuencia situada en el extremo N-terminal de algunas proteínas que las lleva a entrar en la vía secretora, principalmente proteínas transmembranas y proteínas secretadas. La mayoría están constituidos por entre 15-30 aminoácidos. Sin embargo, existen algunos péptidos señal de mayor extensión, llegando a tener incluso más de 100 aminoácidos (Hegde and Bernstein, 2006). A pesar de no haber homología de secuencia entre péptidos señal como se muestra en la Figura 17A, la mayoría presentan una estructura similar. Se distinguen tres regiones distintas, **n**, **h** y **c**: la región N-terminal (**n**) de longitud variable y caracterizada por contener aminoácidos pequeños con una carga neta positiva, es la que contribuye a la variación respecto a la longitud. A continuación, la región central, siendo una región hidrofóbica (**h**) con una extensión de entre 7-15 aminoácidos, es la parte esencial del péptido señal para el *targeting* y la inserción en la membrana del retículo endoplasmático. Y finalmente, la región C-terminal (**c**), de menor tamaño con 3-7 aminoácidos, entre ellos se encuentra una secuencia consenso que consiste en un aminoácido de cadena corta en la posición -1 y uno no cargado en la posición -3, que determinan el sitio de corte por la enzima *Signal peptidase* (**SPase**), en la posición 0.

La función principal del péptido señal es mediar el transporte de la proteína secretada o de membrana que está iniciando su traducción a la membrana del RE. A este proceso se le denomina *targeting* (Walter and Johnson 1994) (Figura 17B). Puede realizarse por una vía dependiente o una independientemente de la ribonucleoproteína SRP (del inglés, *Signal Recognition Particle*). El SRP se une al péptido señal por su región h y lo lleva hacia la membrana del RE, donde se produce la unión del SRP con su receptor. Ello lleva a la inserción del péptido señal en el translocón, un complejo de proteínas heterotriméricas que media el paso de polipéptidos a través de la membrana del RE, quedando la región n en el lado citosólico y la región c en el lumen del retículo (topología II). A continuación, se prosigue con la traducción de la proteína por los ribosomas. El péptido señal debe escindirse de la proteína traducida. Este procesamiento lo realiza la SPase y suele ocurrir normalmente de forma co-traducciona. Se ha descrito que después de sufrir este procesamiento, el péptido señal puede seguir varias rutas: degradarse, quedarse anclado en la membrana o liberarse al citoplasma donde puede ejercer una función.

Si bien la función principal del péptido señal es la de guiar a la proteína que está iniciando su traducción hacia la membrana del RE, también se ha visto que puede afectar a la interacción con el translocón o regular la eficiencia con la que se inserta en la membrana (Kim *et al.*, 2002; Ott and Lingappa, 2004).

Después de ser procesadas por la SPase, los péptidos señal quedan insertados en la membrana del RE. Algunas veces estos pueden sufrir un procesamiento adicional en la región hidrofóbica (h) por la enzima *Signal Peptide Peptidase* (**SPPase**). Esta enzima es un miembro de las proteasas aspárticas y está relacionada con la preselinina (la subunidad proteolíticamente activa del complejo de la gamma-secretasa). Al igual que la SPase, se localiza en el RE. El corte del péptido señal por la SPPase lleva a la liberación de péptidos para su posterior degradación (Kilic *et al.*, 2010) o estos podrían ser bioactivos y tener nuevas funciones (Kapp *et al.*, 2009).

En *Drosophila*, existe un homólogo poco caracterizado para esta enzima cuya pérdida de función produce letalidad larvaria y defectos en el desarrollo de las tráqueas (Casso *et al.*, 2012). Asimismo, la proteína Crumbs de *Drosophila*, caracterizada por tener un péptido señal largo, ha sido descrita como un sustrato para la SPPase, aunque se desconoce si los péptidos

que se generan a partir del péptido señal de Crumbs poseen una función adicional (Kilic *et al.*, 2010). En vertebrados, la SPPase está implicada en la regulación del sistema inmune y participa en la maduración de la proteína del núcleo del virus de la hepatitis C, entre otras (Moriishi, 2017). Por tanto es considerada una diana terapéutica para enfermedades virales.

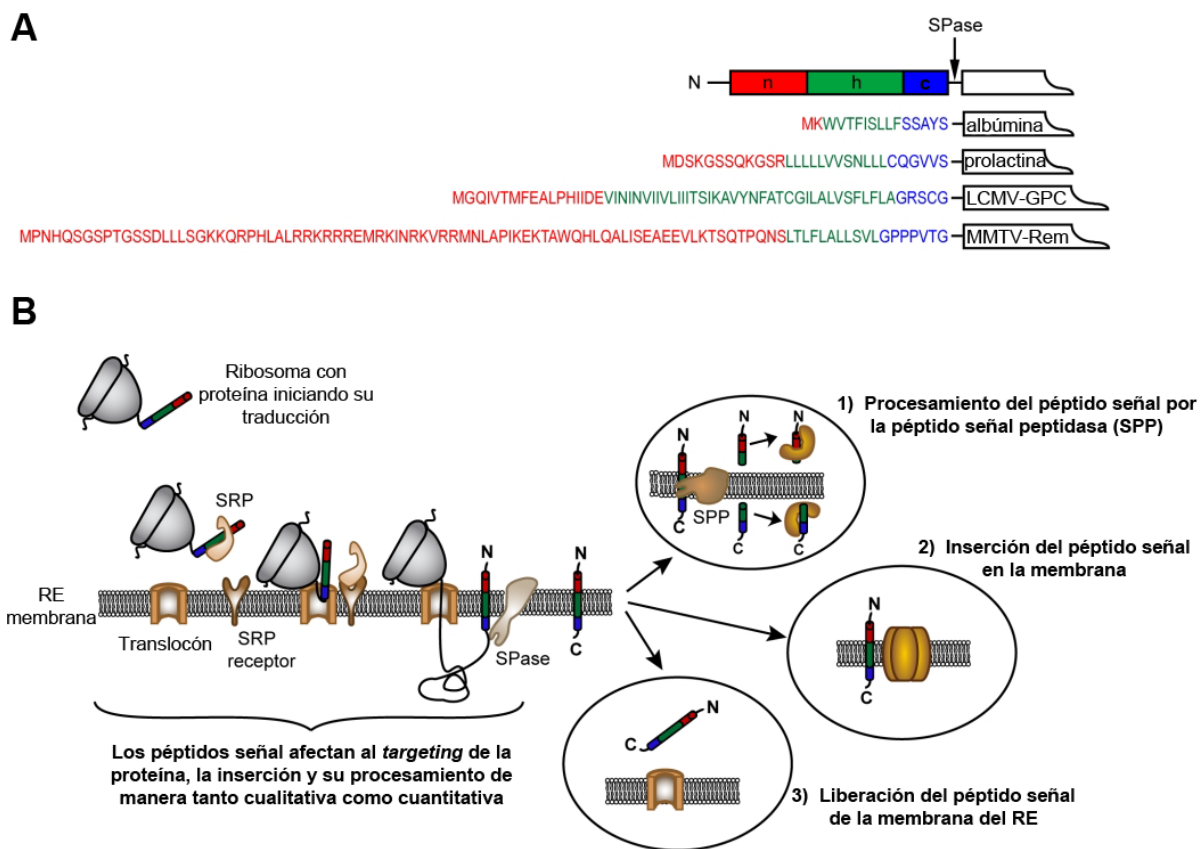


Figura 17. Estructura y mecanismo de acción de los péptidos señal. (A) Representación esquemática de la estructura del péptido señal, compuesto de tres partes bien diferenciadas: (n) extremo N-terminal, (h) región hidrofóbica y (c) extremo C-terminal. Debajo se muestran algunos ejemplos. (B) Esquema general de la función del péptido señal. Al iniciarse la traducción de una proteína que contiene un péptido señal, éste interacciona con la proteína de reconocimiento de señal o SRP que la guía hacia el RE al unirse con el receptor SRP. Allí el ribosoma facilita la entrada del péptido señal hacia el interior del translocón y tiene lugar la finalización de la traducción de la proteína. Esto conlleva el procesamiento del péptido señal por una enzima específica denominada *signal peptidase*, SPase. Tras esto, el fragmento puede seguir diferentes rutas ejerciendo funciones adicionales o degradándose. Tomada y modificada de www.signalpeptide.de.

La mayor parte de los péptidos señal que ejercen funciones adicionales al transporte de la proteína hacia el RE, suelen ser de gran longitud. No obstante, no todos los péptidos señal largos presentan una función adicional. A continuación, describiremos algunos ejemplos:

- El virus del tumor mamario de ratones (MMTV, del inglés, *Mouse Mammary Tumor Virus*) es un retrovirus tipo B, causante de carcinomas mamarios y de linfomas de células T (Michalides *et al.*, 1982; Racevskis and Sakar, 1982). La proteína Rem procede de una versión truncada de la proteína envelope (Env) de este virus. Ambas comparten el mismo péptido señal

cuya extensión es de 98 aminoácidos y el cual contiene una secuencia de localización nuclear (NLS, del inglés, *Nuclear Localization Signal*) en la región n (1-80) (Figura 18A). El péptido señal es procesado co-traduccionalmente por la enzima SPase, quedando retenida en el retículo y posteriormente liberado al citosol por un proceso independiente a la enzima SPPase. Finalmente, el péptido señal o la proteína completa (gp32Rem + SP) van hacia el núcleo actuando como factores de exportación nuclear para transcritos con intrones (Figura 18B) (Dultz *et al.*, 2008).

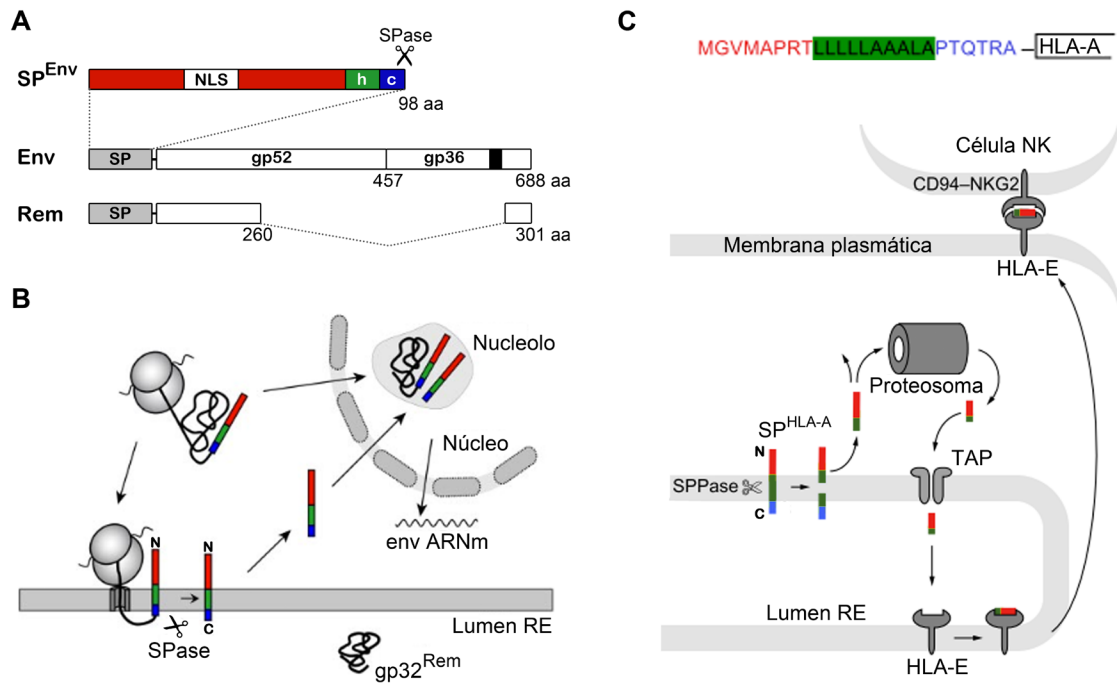


Figura 18. Ejemplos de péptidos señal que poseen funciones adicionales. (A) Representación esquemática del péptido señal que comparten las proteínas Envelope y Rem del virus del tumor mamario de ratones (MMTV), el cual contiene una secuencia de localización nuclear (NLS) en la región N-terminal. (B) Mecanismo de acción mediante el cual el péptido señal es procesado co-traduccionalmente en la membrana del RE mediante la enzima SPase. El péptido señal resultante es liberado de la membrana y transportado al núcleo donde realiza su función. Tomada y modificada de Dultz *et al.*, 2008. (C) Arriba se muestra el péptido señal de la molécula HLA-A. Las distintas regiones se diferencian según el color: Rojo (n), verde (h) y azul (c). Debajo se expone el proceso mediante el cual se cargan y se presentan los distintos fragmentos de péptidos señal de las MHC-I clásicas por las moléculas HLA-E. Tomada y modificada de Martoglio and Dobberstein, 1998.

- El complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (**MHC-I**), presenta péptidos a las denominadas células T natural killer (NK) o células T citotóxicas para informar al sistema inmune de que hay una célula infectada por un virus y que éstas puedan reconocerlas y eliminarlas. Este reconocimiento es llevado a cabo por las moléculas clásicas: HLA-A, -B, -C. Por otra parte, la molécula no clásica HLA-E se une selectivamente a fragmentos derivados de la región n del péptido señal de las anteriores: HLA-A, -B o -C. Estos péptidos señal están altamente conservados y son procesados co-traduccionalmente por la SPase y posteriormente por la SPPase en la membrana del RE. El resultado de este último procesamiento es la liberación al citosol de un fragmento de unos 14 residuos conteniendo la región N-terminal y parte de la región hidrofóbica. Este es recortado por el proteosoma. Los fragmentos resultantes son

transportados por un transportador presentador de antígenos (TAP; del inglés, *Transporter of Antigen Presentation*) hacia el lumen del RE. Allí, se unen a las moléculas HLA-E y son transportadas a la superficie celular donde el complejo HLA-E/péptido interacciona con el receptor de las células NK, inhibiendo o activando, dependiendo de cada caso, a las células NK. Esta unión permite un control adicional para el reconocimiento entre las moléculas MHC-I y los receptores de las NK, ya que informa de los niveles de expresión de las moléculas MHC-I clásicas (Kapp *et al.*, 2009) (Figura 18C).

OBJETIVOS

15%
K-HA

8%

E		K-HA	
R	Φ	R	Φ

5min

K-GFP

15%
K-HA

8%
K-HA

12.5%
K-HA

0.21 K-HA
E 0.3 ± 0.5
R Φ R Φ

0.5 0.7

- 1. Caracterizar la diversidad funcional generada por las distintas isoformas de los receptores de lipoforinas.**
- 2. Estudiar la interacción de los receptores de lipoforinas con las lipoproteínas lipoforina y LTP y formular un modelo molecular de cómo los tres elementos participan en el proceso de toma celular de lípidos neutros.**
- 3. Analizar la interacción de los receptores de lipoforinas con la Peroxidasina, un ligando no relacionado con el metabolismo lipídico.**

-REPETIR: LpRID: LpR1, Ap2, Lp.
Los discos se han aplastado y
poros con exp.

α LpR1 1:100 GP G

α HA 1:500 Ra

α Golgi

-PONER TUBOS

MATERIALES Y MÉTODOS

α -HA Rat 1:500

α -AFP m

α -Lp Rb 1:500

α -HA

α -LpR1 1:100 GP (G) 1pel

α -Golgi 1:100 m (B) 1pel

α -Lp 1:500 Rb (R) 0,4pel

*HA 1:500 Rat R. 0,4

Boca 1:500 GP G.

Ap2 1:50

2pel

1. GENÉTICA

1.1. Sistema *UAS/Gal4/Gal80^{ts}*

Durante el desarrollo de esta tesis ha sido necesario sobre-expresar múltiples transgenes de manera dirigida y específica, para ello hemos utilizado el sistema UAS/Gal4 (Brand and Perrimon, 1993). Este sistema se basa en el factor de transcripción Gal4 de levaduras que activa la transcripción de genes que contengan las secuencias reguladoras UAS en el promotor (del inglés, *Upstream Activation Sequence*). Esta secuencia no une ningún factor de transcripción de *Drosophila*, ni hay en *Drosophila* secuencias reconocidas por la proteína Gal4 (Figura 19A). Existen multitud de cepas de *Drosophila* que expresan el factor Gal4 en tejidos con patrones específicos. Por otro lado, se pueden generar cepas con un transgen de interés bajo control de la secuencia reguladora UAS. Por lo tanto, cruzando las dos cepas, la línea activadora Gal4 y la cepa UAS, obtendremos en la descendencia animales con la expresión espacio-temporal deseada de nuestro transgen de interés (Figura 20).

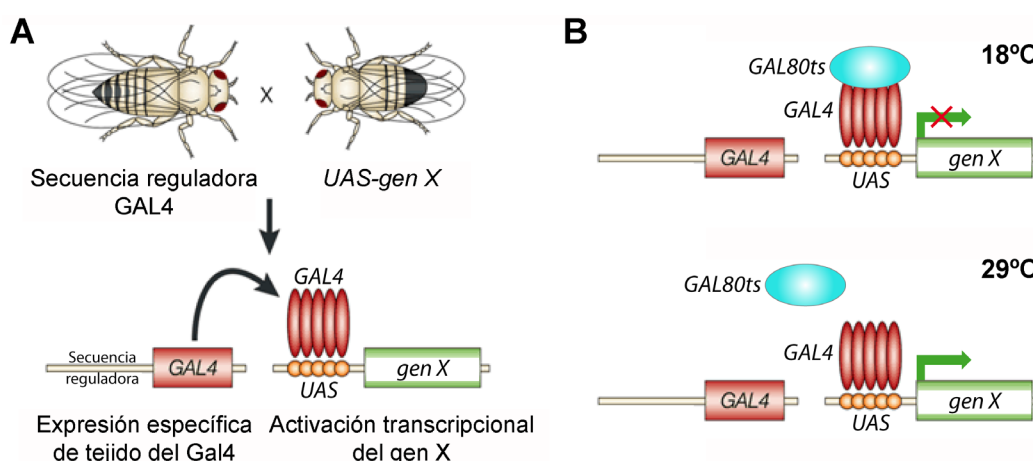


Figura 19. Representación del sistema *UAS/Gal4/Gal80^{ts}*. (A) Esta técnica permite la activación transcripcional del transgen de interés (gen X) regulado por las secuencias UAS, en las células que expresen la proteína Gal4. (B) A 18°C el represor Gal80^{ts} está unido al factor de transcripción Gal4 impidiendo la transcripción del gen de interés (gen X). En cambio, a 29°C, la proteína Gal80^{ts} se disocia del Gal4, permitiendo que active la transcripción. Imagen modificada de Muqit and Feany, 2002.

Este sistema también nos permite la expresión de ARN interferentes (ARNi) de doble cadena con homología a un gen de interés, pudiendo inducir de esta manera el silenciamiento del mismo en un patrón espacio-temporal definido (Nagel *et al.*, 2002).

El sistema UAS/Gal4 se puede utilizar combinado con la proteína Gal80 para proporcionar un mayor control temporal. La proteína Gal80 de levaduras se une al dominio activador de Gal4 e inhibe su actividad (Lue *et al.*, 1987). Existe además un alelo termosensible de esta proteína (Gal80^{ts}) que sólo es funcional a baja temperatura. La expresión ubicua de Gal80^{ts} mediante el promotor del gen de la tubulina permite controlar la actividad del Gal4 simplemente variando la temperatura. Así, a 18°C el Gal80^{ts} se encuentra inhibiendo la actividad del Gal4, sin embargo, cuando pasamos a temperatura restrictiva (29°C) el Gal80^{ts} queda inactivado, permitiendo que el Gal4 active la expresión del transgen (McGuire *et al.*, 2003) (Figura 19B).

1.2. Cepas de *Drosophila*

Tanto las cepas como los cruces realizados en esta tesis se mantuvieron en un medio de cultivo estándar para *Drosophila* y en un incubador a 25°C, salvo excepciones especificadas en cada caso. A continuación, se muestran las cepas utilizadas durante el desarrollo de este trabajo.

LÍNEAS UAS	Sitio de inserción/#Chr	Origen
<i>UAS-apoLp-i</i>	#2	VDRC
<i>UAS-apoLTP-i</i>	#3	Rodríguez-Vázquez <i>et al.</i> , 2015
<i>UAS-diap1</i>	#3	BDSC
<i>UAS-gfp</i>	#2	BDSC
<i>UAS-hldlr-HA</i>	22A/ #2	Parra-Peralbo, no publicado
<i>UAS-hvldlr-HA</i>	22A/ #2	Parra-Peralbo, no publicado
<i>UAS-lamp1</i>	#2	Pulipparacharuvil <i>et al.</i> , 2005
<i>UAS-lpr1D</i>	#3	Parra-Peralbo and Culi, 2011
<i>UAS-lpr1H-HA</i>	22A/ #2	Parra-Peralbo and Culi, 2011
<i>UAS-lpr1J-HA</i>	22A/ #2	Parra-Peralbo and Culi, 2011
<i>UAS-lpr1M-HA</i>	51D/ #2	Esta tesis
<i>UAS-lpr2E_ecto-TAP</i>	#2	Rodríguez-Vázquez <i>et al.</i> , 2015
<i>UAS-lpr2E-HA</i>	22A/ #2	Parra-Peralbo and Culi, 2011
<i>UAS-lpr2E-HA-Flag</i>	51D/ #2	Esta tesis
<i>UAS-lpr2E-HA-Myc</i>	22A/ #2	Esta tesis
<i>UAS-lpr2F_ecto-TAP</i>	#2	Rodríguez-Vázquez <i>et al.</i> , 2015
<i>UAS-lpr2F-HA</i>	22A/ #2	Parra-Peralbo and Culi, 2011
<i>UAS-lpr2F-HA-Flag</i>	51D/ #2	Esta tesis
<i>UAS-lpr2F-HA-Myc</i>	22A/ #2	Esta tesis
<i>UAS-lpr2F+LA1-HA</i>	22A/ #2	Parra-Peralbo and Culi, 2011
<i>UAS-lpr2F+LA1+ED-HA</i>	22A/ #2	Parra-Peralbo and Culi, 2011
<i>UAS-lpr2F+LA1+NCN-HA</i>	22A/ #2	Parra-Peralbo and Culi, 2011
<i>UAS-lpr2F+NCN-HA</i>	22A/ #2	Parra-Peralbo and Culi, 2011
<i>UAS-lpr2F+NCN-HA-Myc</i>	22A/ #2	Esta tesis
<i>UAS-Lpr2F^{ΔICD}-HA</i>	#2	Parra-Peralbo, no publicado
<i>UAS-perdido-HA</i>	#2	Schnörrer <i>et al.</i> , 2007
<i>UAS-rab5-GFP</i>	#3	Wucherpfenning <i>et al.</i> , 2003
<i>UAS-SP(Crb)_lpr2F-HA</i>	22A/ #2	Esta tesis
<i>UAS-SP(E)_lpr2F-HA</i>	22A/ #2	Esta tesis
<i>UAS-SP(E)_lpr2F-HA-Myc</i>	22A/ #2	Esta tesis
<i>UAS-SP(F)_lpr2E-HA</i>	22A/ #2	Esta tesis
<i>UAS-SP(F)_lpr2E-HA-Myc</i>	22A/ #2	Esta tesis
<i>UASp-lpr2E-HA</i>	#2	Parra-Peralbo and Culi, 2011
<i>UASp-lpr2F-HA</i>	#2	Parra-Peralbo and Culi, 2011

VDRC: Vienna *Drosophila* Resource Center. BDSC: Bloomington *Drosophila* Stock Center.

LÍNEAS ACTIVADORAS: Gal4/Gal80^{ts}

	Origen
AB.1-Gal4	BDSC
<i>apterous-Gal4</i> (<i>ap-Gal4</i>)	BDSC
<i>Cg-Gal4</i>	Rusten <i>et al.</i> , 2004
<i>elav-Gal4</i>	BDSC
<i>engrailed-Gal4</i> (<i>en-Gal4</i>)	A. Martínez Arias
<i>Fat Body-Gal4</i> (<i>FB-Gal4</i>)	Grönke <i>et al.</i> , 2003
<i>heat shock-Gal4</i> (<i>hs-Gal4</i>)	Tanimoto <i>et al.</i> , 2000
<i>hedgehog-Gal4</i> (<i>hh-Gal4</i>)	BDSC
<i>MD638-Gal4</i>	BDSC
<i>nubbin-Gal4</i> (<i>nub-Gal4</i>)	BDSC
<i>patched-Gal4</i> (<i>ptc-Gal4</i>)	BDSC
<i>repo-Gal4</i>	BDSC
<i>tub-Gal80^{ts}</i>	McGuire <i>et al.</i> , 2003
<i>V32-Gal4</i>	Daniel St. Johnson

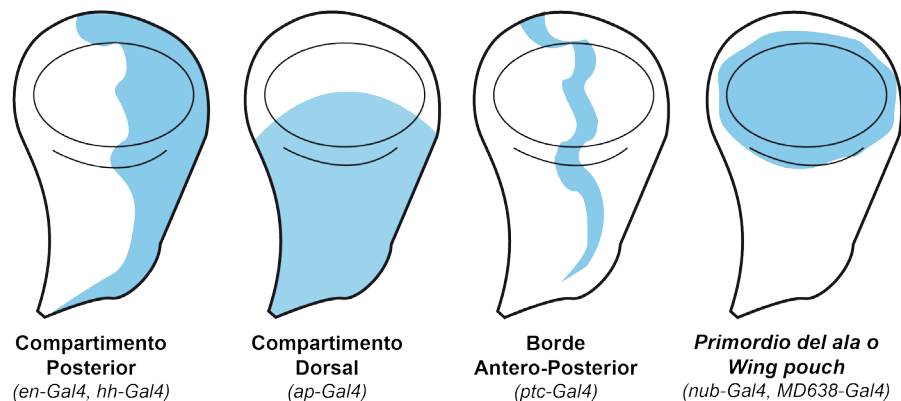


Figura 20. Patrón de expresión de algunas líneas Gal4. La región azul muestra la zona donde se expresan las líneas activadoras indicadas abajo. De izquierda a derecha se muestran el compartimento posterior, dorsal, borde antero-posterior y primordio del ala (*wing pouch*).

LÍNEAS MUTANTES

	Origen
<i>Df(3R)lpr2[1.40]</i>	Parra-Peralbo and Culi, 2011
<i>Df(3R)lpr1/2[2.41]</i>	Parra-Peralbo and Culi, 2011
<i>shibire termosensible</i> (<i>shi^{ts}</i>)	Grigliatti <i>et al.</i> , 1973

OTRAS LÍNEAS

	Origen
Oregon R (OR) (Silvestre)	BDSC
<i>white</i> (<i>w</i>)	BDSC
<i>sqh-EYFP-ER</i>	BDSC
<i>Pxn[CPTI003897]-YFP</i>	Kyoto Stock Center

1.3. Inhibición de la endocitosis: *shi^{ts}*

Para conseguir una mayor cantidad de proteína en la membrana, en algunos experimentos inhibimos la endocitosis haciendo uso de un alelo termosensible de la proteína Shibire (Shi), homóloga a la dinamina de humanos. Esta proteína termosensible queda inactivada de forma reversible a 33°C, bloqueándose por tanto la endocitosis. Para la realización de estos experimentos, se cruzaron hembras homocigotas de genotipo: *shi^{ts}; hh-Gal4/TM6b* con machos que llevaban un transgen UAS para la expresión de una de las isoformas o quimeras de los receptores de lipoforinas. Mantuvimos el cruce a 25°C y tras la eclosión de las larvas, éstas se transfirieron a 18°C. Una vez que las larvas estuvieron en estadio LIII, se seleccionaron machos, hemocigotos para *shi^{ts}* y que llevaran tanto el transgen UAS como la línea activadora *hh-Gal4*. Éstas se incubaron a la temperatura restrictiva (33°C) durante 3 horas en un tubo de cristal con un papel de filtro humedecido en su interior para que el cambio de temperatura fuera más homogéneo y rápido. Finalmente, se transfirieron rápidamente a hielo para evitar que la endocitosis tuviera lugar y se procedió a la disección y fijación de los discos imaginales de ala a 4°C.

Para el estudio de la estabilidad de la unión entre los ligandos LTP y lipoforina con el receptor Lpr2E *in vivo* mostrado en la Figura 55, se inhibió la endocitosis durante 3 horas, se diseccionaron los discos imaginales de ala de larvas LIII en medio de cultivo Sf-900 II SFM en hielo y se incubaron posteriormente en el mismo medio durante 30 o 60 minutos a 4°C. Después de esta incubación, fueron fijados y procesados siguiendo el protocolo estándar.

1.4. Generación de clones de falta de función

Para la inducción de clones mitóticos de falta de función se utilizó el sistema FLP/FRT (Xu and Rubin, 1993), que consiste en inducir la recombinación entre cromosomas homólogos que llevan una secuencia FRT (del inglés *Flippase Recognition Target*) en posiciones análogas, expresando artificialmente la enzima flipasa recombinasa (FLP) de levadura. Si ocurre recombinación y durante la segregación de los cromosomas en el proceso de mitosis, una de las células hijas obtiene dos copias del cromosoma mutante (clon mutante) y la otra célula hija dos copias con el marcador (clon gemelo) (Figura 21).

La expresión de la flipasa está regulada por un promotor inducible de la proteína de choque térmico hsp70. Para su activación incubamos las larvas en el estadio deseado a 37°C durante 1 hora. Los clones son visibles por la ausencia de un marcador de expresión ubiqua, por ejemplo, GFP (Davis *et al.*, 1995) y van acompañados de un clon gemelo, conteniendo doble copia del marcador.

Los genotipos utilizados fueron los siguientes:

- a) *y, w, hs-flp; FRT82B,ubi-GFP/FRT82B,Df(3R)lpr1/2[2.41]*
- b) *shi^{ts},FRT9.2/ubi-GFP,FRT9.2;hs-flp/+*

En nuestro caso, para inducir los clones en discos imaginales de alas (genotipo a), se realizó un choque térmico de 1 hora a 37°C a las 48-72 horas tras la puesta. Una vez que las larvas llegaron al estadio adecuado (LIII), diseccionamos y fijamos los tejidos. Para la generación de los clones *shi^{ts}* en discos imaginales de ala (genotipo b), se indujo un choque térmico a 37°C

durante 1h a las 48-72h. Tras ello, las larvas se mantuvieron a 18°C hasta llegar a estadio LIII. En ese momento se pasaron a temperatura restrictiva (33°C) durante 8 horas y se diseccionaron.

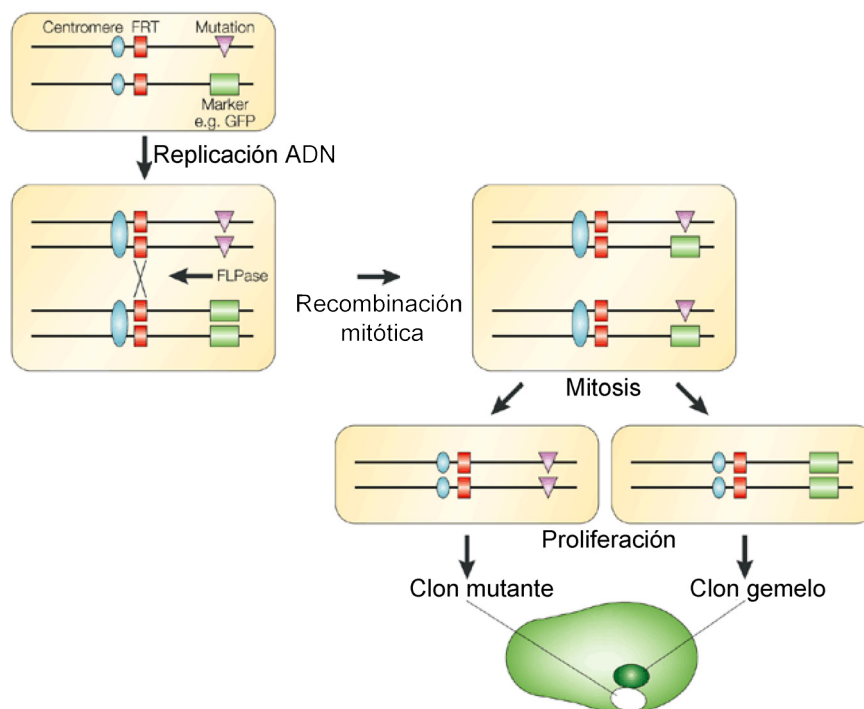


Figura 21. Representación de la generación de clones de falta de función. El sistema FLP/FRT permite que tras la replicación y segregación de los cromosomas se puedan obtener células con dos copias de la mutación obteniendo el clon mutante deseado acompañado de su clon gemelo con doble copia del marcador. Imagen modificada de Tabata, 2001.

2. INMUNOHISTOQUÍMICA

2.1. PROTOCOLO ESTÁNDAR: Inmunotinción de discos de alas, ovarios, glándulas salivales y cuerpo graso

Los diferentes tejidos diseccionados se fijaron en paraformaldehído (PFA) disuelto en PBS al 4% y a continuación, en PFA suplementado con Tritón X-100 al 0,1% durante 20 minutos, ambas a temperatura ambiente. A continuación, los tejidos se lavaron cuatro veces en PBS más TritónX-100 al 0,3% (PBT) durante un total de una hora. Posteriormente, se bloquearon durante otra hora con BSA al 1% disuelta en PBT. La incubación con los anticuerpos primarios disueltos en PBT-BSA se realizó durante toda la noche a 4°C, utilizando las concentraciones indicadas en el apartado 7.1. Tras la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron una serie de lavados con PBT y PBT-BSA durante una hora al igual que describimos previamente, e incubamos con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a fluorocromos Alexa-Fluor de Invitrogen, disueltos en PBT-BSA (1/500), durante 2 horas. En los casos en que se utilizaron colorantes tales como DAPI (núcleos) y Faloidina conjugada con rodamina (actina-F), éstos se añadieron junto con los anticuerpos secundarios a la concentración indicada en el apartado 7.1 de Métodos. Por último, los tejidos se lavaron varias veces con PBT durante un total de una hora y se montaron en Vectashield (Vector Lab).

En el caso de los ovarios, al ser un tejido de mayor tamaño, las fijaciones se realizaron durante 30 minutos cada una y el anticuerpo secundario se incubó durante toda la noche a 4°C.

Los lípidos fueron visualizados con dos tipos distintos de colorantes: **Nile Red** y **Oil red O**. Para la utilización del Nile Red, los discos imaginales de ala u ovarios previamente fijados, fueron incubados con 0.002% de Nile Red diluido en PBT durante 1 hora y lavados durante 10 minutos en PBT. En el caso del Oil Red O, los discos imaginales fueron incubados en una solución al 0.5% de Oil Red O en propilen glicol a 60°C durante 1 hora y después se realizaron dos lavados en propilen glicol al 85% y tres veces en PBS (Tennesen *et al.*, 2014)

2.2. Tinción extracelular

Para la detección de las proteínas extracelulares, utilizamos un protocolo modificado de Strigini and Cohen, 2000, en el cual, todo el proceso se lleva a cabo a 4°C para inhibir la endocitosis. Los discos imaginales fueron diseccionados (y acumulados) en medio de cultivo Sf-900 II SFM de Gibco mantenido en hielo. A continuación, se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo primario de la proteína de interés disuelto en medio de cultivo, también en hielo, a una concentración 10 veces superior a la indicada para la inmunotinción estándar (mostradas en el apartado 7.1 de Métodos). Seguidamente, se realizaron cuatro lavados a 4°C con PBS 1X durante 30 minutos en total y se fijaron con PFA al 4%, primero a 4°C durante 10 minutos y luego a temperatura ambiente. A partir de ese punto, se continuó el protocolo estándar descrito previamente.

En algunos casos (Figura 34), realizamos tinciones dobles combinando la tinción extracelular con la tinción total (protocolo estándar). Tras la fijación, los lavados en PBT y el bloqueo en PBT-BSA, se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche como se ha mencionado previamente en el protocolo estándar.

Para estudiar la distribución extracelular de la lipoforina en discos imaginales de ala en larvas con niveles reducidos de LTP mostrado en la Figura 53, usamos los siguientes genotipos:

Cg-Gal4, tub-Gal80^{ts}/UAS-lpr2E-HA; hh-Gal4/UAS-apoLTP-i
Cg-Gal4, tub-Gal80^{ts}/UAS-lpr2E-HA; hh-Gal4/+ (Control)

Los cruces se mantuvieron a 18°C y cuando las larvas se encontraban en estadio LII o LIII temprano, fueron transferidas a 29°C durante 2 días para activar los transgenes UAS. Finalmente, se siguió el protocolo de tinción extracelular.

2.3. Inmunotinción en células S2 de *Drosophila melanogaster*

Sembramos entorno a 300.000 células por cámara en un portaobjetos con 8 cámaras de Lab Tek. Después de unas 2 horas, las células se adhirieron a la superficie. A continuación, se procedió con el protocolo de transfección, que varía en función del reactivo utilizado (Cellfectin® de Invitrogen o Effectene® de Qiagen). Ver en más detalle en el apartado 3.1 de Métodos. Una vez transfectadas las células, se procedió con el protocolo estándar de inmunotinción descrito previamente, pero en este caso reduciendo los periodos de incubación: 10 minutos

para cada fijación y lavados. Al finalizar, se montó la preparación en Vectashield (Vector Lab). Durante todo el proceso, hay que tener especial cuidado para evitar que las células se desprendan de la superficie del portaobjetos ya que las células S2 se adhieren sólo parcialmente.

Todas las imágenes de esta tesis están tomadas con el microscopio de confocal Leica SP2 DME ó Leica TCS SPE; y procesadas con el programa ImageJ para realizar las proyecciones y secciones en el eje Z.

3. CULTIVOS CELULARES

Utilizamos la línea celular Schneider 2 (S2) de *Drosophila melanogaster*. Esta línea procede de un cultivo primario de embriones en estadio tardío (20-24 horas) (Schneider, 1972) y probablemente deriva de macrófagos. A diferencia del cultivo celular de células humanas, no requieren CO₂ ni suero en el medio de cultivo, crecen a temperatura ambiente y son semi-adherentes. En este caso, las células S2 se mantuvieron a 25°C en frascos de Roux de 160 ml (nuncTM), con medio de cultivo Sf-900 II SFM de Gibco suplementado con Penicilina (50 U/ml) y Estreptomicina (50 µg/ml).

3.1. Transfección de células S2

Se indujo la expresión de los diferentes transgenes en la línea celular S2 de *Drosophila*. Para ello, los ADNs contenidos en el vector de expresión pUASattb se co-transfectaron junto a pAC-Gal4 (expresa constitutivamente la proteína Gal4 y activa la transcripción de los transgenes UAS) y pAC-LacZ, este último nos servirá para medir la eficiencia de transfección mediante el ensayo β-galactosidasa.

Sembramos entorno a 2.5×10^6 células en 3.5 ml de medio por pocillo en una placa de 6 pocillos de VWR (previo conteo en una cámara de Neubauer). Esperamos que las células se adhieran a la superficie durante al menos 2 horas. A continuación, se procede al protocolo de transfección, que varía en función del reactivo utilizado: *Cellfectin® II Reagent* de Invitrogen o *Effectene®* de Qiagen (Figura 22).

Cellfectin® II Reagent:

Se transfectaron 5 µg de ADN total por pocillo y se distribuyeron dependiendo de si el transgen requería del factor de transcripción Gal4 (*UAS-transgen*) o si estaba contenido en un vector con promotor ubicuo (pAC-transgen)

<i>UAS-transgen</i>	pAC-transgen
10% pAC-LacZ	
22.5% pAC-Gal4 (1/3 del UAS)	90% pAC-Transgen
66.5% <i>UAS-transgen</i>	

Se mezclaron por un lado los 5 µg de ADN total y por otro lado 20 µl del reactivo *Cellfectin*[®] II Reagent, con medio de cultivo sin antibiótico. Mezclamos ambas soluciones e incubamos durante 20 minutos a temperatura ambiente para que se formaran los complejos lipídicos conteniendo el ADN. Añadimos medio sin antibiótico y lo agregamos a las células. Se dejó durante 3 horas para que las células incorporaran estos complejos. Tras ese periodo de tiempo, se retiró el contenido con cuidado de no arrastrar células y añadimos medio condicionado. Dejamos que se expresara el transgen durante 24-48 horas.

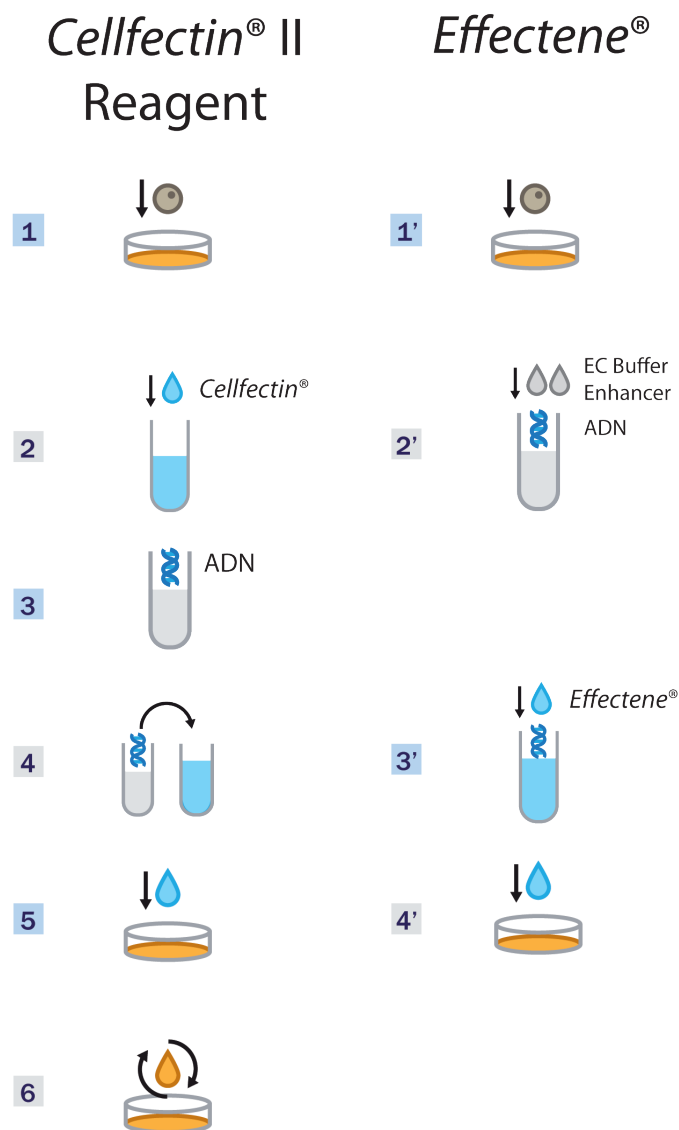


Figura 22. Representación esquemática del proceso de transfección de células S2 de *Drosophila* mediante dos reactivos diferentes: *Cellfectin*[®] II Reagent y *Effectene*[®]. (1-1') Se siembran las células y se dejan que se adhieran a la superficie. Con *Cellfectin*[®] se añade el reactivo (2) y el ADN (3) en tubos independientes con medio de cultivo. Posteriormente, se mezclan y se deja incubar durante 20 minutos (4). Con *Effectene*[®], se mezclan los distintos componentes del kit: *EC Buffer*, *Enhancer* y el ADN, y se incuban durante 5 minutos con medio de cultivo (2'). A continuación, se incorpora el reactivo *Effectene*[®] durante 8 minutos (3'). Las mezclas (4) y (3'), se incorporan a las células y se deja actuar durante 3 horas (5) o 24-48 horas (4'). Con *Cellfectin*[®] se realiza un paso adicional, ya que se debe retirar la mezcla y añadir medio de cultivo condicionado y tras ese proceso, dejar crecer las células durante 24-48 horas (6).

Effectene[®]:

En este caso, se transfectaron 4 µg de ADN total y se distribuyeron en las mismas proporciones que con el reactivo anterior.

El protocolo seguido es una adaptación de M. Zeidler del *Effectene Transfection Reagent Handbook*. Mezclamos los componentes del kit: 200 µl de *EC Buffer* y 16 µl de *Enhancer* junto con el ADN, e incubamos durante 5 minutos a temperatura ambiente para que el ADN se

condensara. Añadimos 20 µl del reactivo *Effectene*®, mezclamos e incubamos durante 8 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo de transfección. A continuación, añadimos medio de cultivo y se distribuyó a las células. Finalmente, dejamos que se expresara el transgen entre 24-48 horas.

Ensayo β -Galactosidasa (β -Gal)

El gen *lacZ* de *Escherichia coli* codifica para la enzima β -galactosidasa que es capaz de hidrolizar la lactosa en sus monómeros glucosa y galactosa. Dicha actividad se puede detectar en extractos celulares usando un sustrato cromogénico artificial denominado *o-nitrophenyl- β -d-galactoside* (ONPG). El ONPG es incoloro, sin embargo, tras la hidrólisis producida por la enzima, se produce un compuesto de color amarillo que absorbe la luz a 420 nm, medible en el espectrofotómetro.

Para medir la actividad β -galactosidasa (Zhang y Bremer, 1995), mezclamos 25 µl de los extractos junto con 450 µl del tampón Z (que debe prepararse en el momento) y 100 µl del sustrato ONPG. Incubamos a 37°C durante al menos 1 hora, hasta que aparece el color amarillo. Posteriormente, se para la reacción con 250 µl de la solución de Stop, y se mide a 420 nm.

4. BIOQUÍMICA

4.1. Ensayo de Co-InmunoPrecipitación (Co-IP)

Este método nos permite detectar la interacción física entre dos proteínas. La proteína de interés se aísla mediante un anticuerpo específico y las moléculas que interaccionan con esta proteína se identifican mediante *western blot*.

a) Protocolo de Co-Inmunoprecipitación

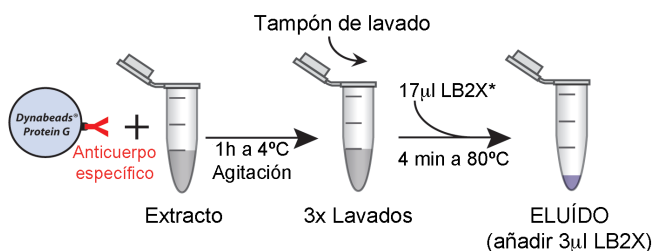
Todas las co-inmunoprecipitaciones siguen el mismo esquema general, salvo pequeñas variaciones que serán detalladas en cada caso. Para su realización, se usaron bolas magnéticas *Dynabeads*® (novex) conjugadas a proteína G, una proteína que une con alta afinidad IgGs de varias especies incluidas el ratón, la rata y el conejo. Esto permite la unión de los anticuerpos correspondientes a estas bolas.

En primer lugar, las *Dynabeads*® se unieron a los distintos anticuerpos específicos, para ello 25 µl de *dynabeads protG* se incubaron con 5-10 µg de anticuerpo y PBS suplementado con 0,002% de Tween-20 a temperatura ambiente, durante 30 minutos en agitación. A continuación, se lavaron las *dynabeads* ayudados con un imán con PBS al 0,002% de Tween-20. Seguidamente, las *dynabeads* cubiertas con el anticuerpo se repartieron en alícuotas iguales para las diferentes muestras. Finalmente, se añadieron los extractos correspondientes, las cantidades varían dependiendo de la procedencia:

- Ovarios: 200-300 µl
- Glándulas salivales: 100 µl
- Células S2: 100 µl (Ver en el apartado 7.3)

Para las **Co-IPs de tejido** (ovarios y glándulas salivales) (Figura 23A), se incubó durante 1 hora en agitación a 4°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con el tampón de lavado durante 30 minutos en total. En este punto, se tomó la precaución de transferir las soluciones a un tubo eppendorf nuevo para evitar el arrastre de proteínas unidas inespecíficamente a las paredes de plástico del tubo. Eluimos las proteínas mediante una incubación a 80°C durante 4 minutos en 17 µl de tampón Laemmli (LB2X) sin azul de bromofenol para asegurarnos de no recoger *dynabeads*. Finalmente, recogimos el eluido ayudados con el imán y añadimos 3 µl del mismo tampón con azul de bromofenol.

A. Co-IP tejido



B. Co-IP células S2

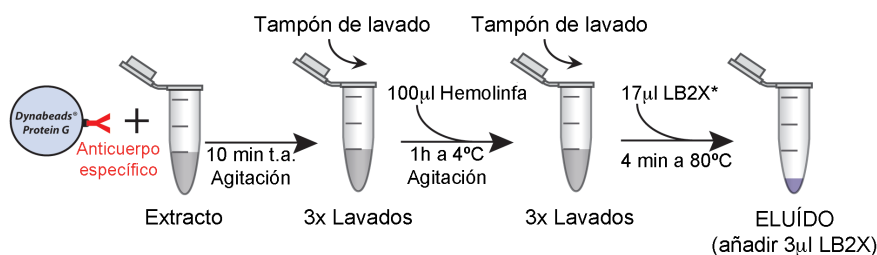


Figura 23. Representación esquemática del protocolo de Co-InmunoPrecipitación.

Diferentes pasos del protocolo de Co-IP a partir de lisados de tejido (A) o de células S2 (B) realizados en esta tesis. El asterisco (*) indica que el LB2X no contiene azul de bromofenol.

En el caso de las **células S2** (Figura 23B), se incubaron en agitación un mínimo de 10 minutos a temperatura ambiente, seguidos de 3 lavados con el tampón de lavado durante 30 minutos. Tras los lavados, incubamos las *dynabeads* con 100 µl de hemolinfa diluida en tampón de lisis, durante 1 hora en agitación a 4°C. Posteriormente, se realizaron otros 3 lavados con tampón de lavado durante 30 minutos en total. Se transfirió las soluciones a un tubo eppendorf nuevo y eluimos las proteínas mediante una incubación a 80°C durante 4 minutos en 17 µl de tampón Laemmli (LB2X) sin azul de bromofenol. Finalmente, recogimos el eluido ayudados con el imán y añadimos 3 µl de LB2X con azul de bromofenol.

Las proteínas fueron detectadas mediante *western blot*, usando membranas de fluoruro de polivinilideno o PVDF. Se revelaron con *Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare Life Sciences) en el *ChemiDoc™ XRS* (BIO-RAD).

En algunos casos, las membranas fueron reusadas después de un primer *western*. Para ello eliminamos los anticuerpos primarios y secundarios mediante un tratamiento de *stripping*. Sumergimos la membrana en la solución de *stripping* (ver apartado 6) e incubamos a 50°C durante 30 minutos agitándola ocasionalmente. Lavamos la membrana dos veces durante 10 minutos con abundante PBT cada vez.

Para minimizar la detección de las IgGs eluidas de la matriz en las Co-IPs, utilizamos en algunos casos proteína A conjugada a HRP: *clean blot*, en lugar de anticuerpo secundario (indicado en el apartado 7.1). La proteína A únicamente se une a IgGs nativas (el anticuerpo primario) y no a las desnaturalizadas (el anticuerpo utilizado para la inmunoprecipitación).

b) Preparación de los extractos

Células S2. Se indujo la expresión de los diferentes transgenes en la línea celular S2 de *Drosophila*. Para ello, los ADNc contenidos en el vector de expresión pUASTattb se co-transfectaron junto a pAC-Gal4, que expresa constitutivamente la proteína Gal4 y activa la transcripción de los transgenes UAS. Entorno a 2 millones de células, fueron lisadas en 300 µl del tampón de lisis (indicado en el apartado 6) durante 10 minutos a 4°C seguidos de un ciclo de congelación y descongelación para garantizar que la lisis fuera completa. Tras la lisis, se centrifugó a 16.000g durante 5 minutos y recogimos el sobrenadante.

Hemolinfa. Expresamos los transgenes *UAS-lpr2E_ecto_TAP* y *UAS-lpr2F_ecto_TAP* en el cuerpo graso mediante la línea activadora *FB-Gal4*. Las larvas previamente lavadas y secadas se depositaron sobre el tampón de lisis 4°C (ver apartado 6 de Métodos). Se diseccionaron realizando una incisión en la cutícula sin dañar órganos internos tales como el cuerpo graso o el intestino, dejando salir de esta manera la hemolinfa y mezclándose con el tampón. Recogimos la hemolinfa diluida y centrifugamos durante 5 minutos a 5000 rpm y a 4°C para eliminar los restos celulares. La hemolinfa fue usada inmediatamente después de ser preparada. Seguimos el mismo protocolo para la elaboración de la hemolinfa diluida de larvas silvestres. Recogimos 15 larvas OR (silvestres) por cada muestra y se depositaron en 100 µl (por muestra) de tampón de lisis.

Para comparar cuantitativamente los niveles de lipoforina y LTP circulantes en la hemolinfa de larvas silvestres (OR) y larvas LTPi mostrado en la Figura 53C. Depositamos 2 larvas del mismo genotipo cada vez, previamente lavadas y secadas, sobre un trozo de parafilm en hielo, y las perforamos con un par de pinzas. La hemolinfa fue recogida por capilaridad con una micropipeta de cristal (Drummond) de 0,5 µl e inmediatamente transferimos el contenido a 20 µl de tampón Laemmli para analizarlo posteriormente por *western blot*.

Ovarios. *UASp-lpr2E-HA* ó *UASp-lpr2F-HA* se expresaron en la línea germinal mediante la línea activadora *V32-Gal4*. Las hembras resultantes se dejaron al menos 4 días en levadura, para que los ovarios se desarrollen y presenten estadios tardíos (10-13), donde se expresan principalmente los receptores de lipoforinas y tiene lugar la adquisición de lípidos (Parra-Peralbo and Culi, 2011). Entre 50-30 ovarios fueron diseccionados y homogeneizados en un homogeneizador de cristal tipo Tenbroeck en 100-500 µl de tampón de lisis (dependiendo del experimento). Se dejaron 10 minutos en hielo y se centrifugaron a 16.000g durante 15 minutos. Finalmente, recogimos el sobrenadante.

Glándulas Salivales. *UAS-lpr2E-HA-Myc*, *UAS-lpr2F-HA-Myc* y *UAS-perdido-HA* se expresaron en glándulas salivales con la línea activadora *AB.1-Gal4*. Se diseccionaron entre 50-100 glándulas de cada genotipo y fueron homogeneizadas en 100 µl de tampón de lisis. Posteriormente, sufrieron un ciclo de congelación y descongelación. Tras este proceso, centrifugamos a 16.000g durante 10 minutos y recogimos el sobrenadante.

4.2. Procesamiento del dominio intracelular

En la Figura 35D detectamos el procesamiento del dominio intracelular tanto en discos imaginales de ala como en células S2 mediante *western blot*. Para ello, los extractos se analizaron en un gel de acrilamida del 8% para ver la proteína completa y del 15% para ver el procesamiento del dominio intracelular. Las proteínas se detectaron con anti-HA.

a) Preparación de los extractos

Discos imaginales de ala. Se expresaron ectópicamente los transgenes *UAS-lpr2E-HA* y *UAS-lpr2F-HA* en la región que dará lugar al ala adulta mediante la línea activadora *MD638-Gal4*. Posteriormente, se diseccionaron 50 discos de ala de larvas LIII procedentes del cruce en PBS1X. Se van acumulando en PBS1X a 4°C. Seguidamente, retiramos el PBS1X y añadimos LB2X hasta un volumen final de 20 µl. Agitamos suavemente e incubamos 5 minutos a temperatura ambiente. Tras ese tiempo, incubamos durante 5 minutos a 96°C.

Células S2. Los ADNs *UAS-lpr2E-HA* y *UAS-lpr2F-HA* se co-transfectaron en células S2 junto con pAC-Gal4 según el protocolo descrito en el apartado 3.1. Una vez transfectadas, se eliminó el medio y se añadió 200 µl de LB2X por pocillo. Mezclamos durante 10 minutos e incubamos durante 5 minutos a temperatura ambiente para que la lisis tuviera lugar. Tras ese periodo de tiempo, se recogió y se incubó a 96°C durante 5 minutos.

4.3. Estudio temporal de la expresión de los receptores de lipoforinas en discos imaginales de ala

Activamos la expresión del receptor en discos de ala por periodos crecientes de tiempo gracias al uso del represor Gal80 termosensible (Gal80^{ts}). Para ello, sobre-expresamos los diferentes transgenes, en un patrón restringido del disco imaginal de ala usando la línea activadora acorde en cada caso. Se mantuvieron los cruces a 25°C y tras la eclosión de las larvas, éstas se transfirieron a 18°C. Una vez que llegaron al estadio adecuado, transferimos de nuevo las larvas a un tubo que previamente hemos preparado con poca papilla y a 29°C. Dejamos durante periodos crecientes de tiempo a 29°C. Tras ello, diseccionamos y preparamos el extracto (*western blot*) o fijamos (inmunotinción). Mostrado en la Figura 39.

a) Western blot

Sobre-expresamos los transgenes *UAS-lpr2E-HA-Myc*, *UAS-lpr2F-HA-Myc* y las quimeras *SP(E)_lpr2F-HA-Myc* y *SP(Crb)_lpr2F-HA* con la línea activadora *nubbin-Gal4* (*nub-Gal4*) en presencia del transgen *tubGal80^{ts}*. *nub-gal4* se expresa en la región del disco imaginal que dará lugar al ala adulta para obtener más cantidad de proteína por tejido. Dejamos a temperatura restrictiva (29°C) para activar la expresión durante 0, 4, 8 y 24h. Para realizar el tiempo 0h (control), recogemos las larvas LIII directamente de 18°C. El extracto (30 discos por muestra) se corrió en un gel de acrilamida y las proteínas se detectaron por *western blot* con anti-Myc o anti-HA.

b) Inmunotinción

Para realizar este ensayo se cruzaron hembras homocigotas para los transgenes *UAS-lpr2E-HA-Myc* y *UAS-lpr2F-HA-Myc* con machos *ap-Gal4/SM5^{TM6b}/tub-Gal80^{ts}*. Tras incubar a temperatura restrictiva durante 6, 24 y 48 horas para activar la transcripción, se seleccionaron las larvas no *TM6b* y se procedió a la disección. Posteriormente, se siguió el protocolo estándar de inmunotinción descrito en el apartado 2.1.

5. BIOLOGÍA MOLECULAR

5.1. Construcción de transgenes

- Construcción de transgenes para la expresión de los receptores de lipoforinas fusionados a un epítipo Flag o Myc en su ectodominio:

Epítipo Flag. Se insertó el epítipo Flag a continuación del péptido señal. En primer lugar, se generó un fragmento por PCR desde el inicio de la proteína hasta unos aminoácidos más allá del péptido señal: para la isoforma *Lpr2E* este fragmento va desde Met1 hasta Leu110, usamos como ADN molde el clon LD1117 (*Berkeley Drosophila Genome Project*: BDGP) y la pareja de cebadores *Lpr2UASFL* y *Lpr2Eflag_R*. En el caso de la Isoforma *Lpr2F* realizamos la PCR a partir del clon GH26833 (BDGP) con los cebadores *Lipophorin5* y *Lpr2Fflag_R* y el fragmento resultante va desde Met1 hasta Leu30. En segundo lugar, se amplificó el resto de la proteína (desde la Leu110/Leu30 hasta el extremo C-terminal). Se usaron los cebadores *Lpr2Eflag_F* y *Lpr2FL_R* para la isoforma *Lpr2E*; y *Lpr2Fflag_F* y *Lpr2FL_R* para la isoforma *Lpr2F*. Para la unión de estos dos fragmentos se realizó una “*overlap extension PCR*” (Figura 24) (Higuchi *et al.* 1988), ya que la secuencia del flag (YKDDDDY) en el extremo 5' contenidos en los cebadores marcados en negrita, hibridaron entre ellas. En el caso de la isoforma *Lpr2E* se usaron los cebadores *Lpr2UASFL* y *Lpr2FL_R* y en el de la isoforma *Lpr2F*, *Lipophorin5* y *Lpr2FL_R*. Posteriormente, los productos de esta PCR fueron secuencialmente subclonados en pSpark® I (canvax), pAC5.1 conteniendo el epítipo HA y pUASTattb.

Por problemas durante la inyección, los transgenes *UAS-lpr2E-HA-Flag* y *UAS-lpr2F-HA-Flag* se insertaron en la posición 51D (2R: en el brazo derecho del segundo cromosoma) en lugar de la posición 22A.

Epítipo 6xMyc. Partimos de los vectores pAC5.1-*lpr2E* y pAC5.1-*lpr2F* (Parra-Peralbo and Culi, 2011). En primer lugar, se insertó una diana NotI entre el dominio EGF-C y la región de O-glicosilación de los receptores, una zona compartida entre las dos isoformas. En concreto, la diana se insertó después del Glu920 para *Lpr2E* o de Glu717 para *Lpr2F*. Para ello se utilizaron los oligos específicos *LpNotGTM_F* y *Lpr2Myc_R*, que fueron previamente fosforilados y utilizados para realizar una PCR inversa (Ochman *et al.* 1988; Triglia *et al.* 1988; Silver and Keerikatte 1989). Estos oligos contienen secuencias adicionales que reconstituyen una diana NotI la cual se incorpora a la secuencia manteniendo la misma fase de lectura y codificando tres alaninas (marcados en rojo en 7.2). Por otro lado, se generó un fragmento que contiene 6 copias del epítipo Myc, también flanqueado por dianas NotI mediante PCR y usando como

ADN molde el vector pCS2+NLS MT con la pareja de oligos Myc_Not_F y Myc_Not_R. Este fragmento fue subclonado en la diana NotI de los vectores descritos anteriormente. Finalmente, los fragmentos conteniendo Lpr2E o Lpr2F fusionados a 6xMyc fueron transferidos al vector pUASTattb (Bischof *et al.*, 2007) mediante subclonaje con las enzimas Asp718 y XbaI para generar finalmente los transgenes *UAS-lpr2E-HA-Myc* y *UAS-lpr2F-HA-Myc*. Hay que tener en cuenta que los vectores iniciales pAC5.1-lpr2E y pAC5.1-lpr2F contienen un epítipo 3xHA en su región C-terminal intracelular, que se ha mantenido en las construcciones aquí descritas.

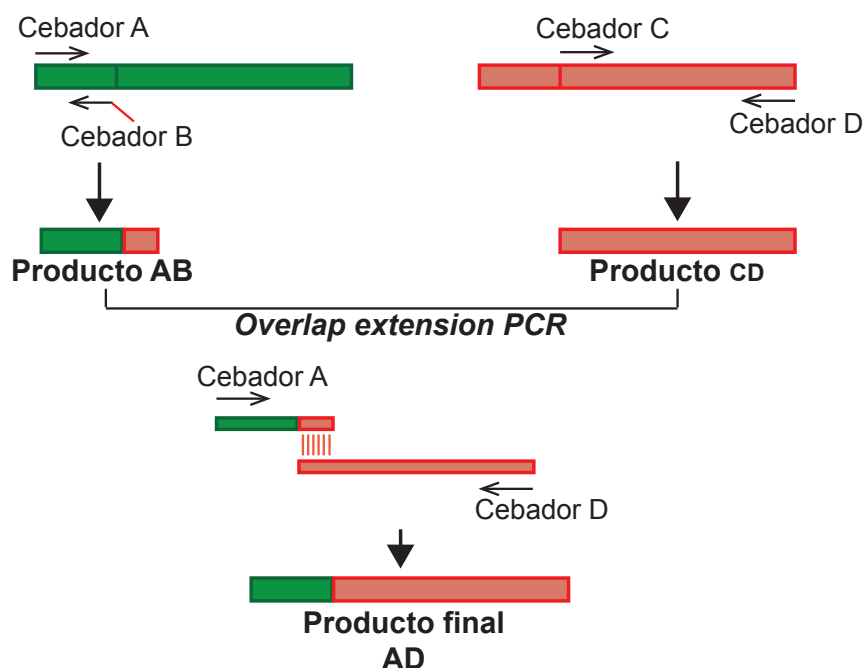


Figura 24. Representación esquemática del proceso de *Overlap Extension PCR*.

Para fusionar dos fragmentos de ADN mediante “overlap extension”, se necesitan 4 cebadores: A, B, C y D. En este ejemplo el cebador B es el que contiene una parte de su secuencia con homología al fragmento que queremos incorporar (región roja). Para que esta técnica sea eficiente, al menos debe de incorporar 18 pares de bases. De esta manera, al obtener los productos AB y CD, y llevar a cabo con ellos el proceso de PCR, la región con homología se solapará permitiendo la amplificación con los cebadores A y D. Obteniendo el producto final AD con los dos fragmentos fusionados.

Estas construcciones sirvieron de base para añadir la etiqueta 6xMyc a *UAS-lpr2F+NCN-HA* y *UAS-SP(E)_lpr2F-HA*. Para ello digerimos con NdeI los vectores pUASTattb-Lpr2F+NCN-HA (Parra-Peralbo and Culi, 2011) y pUASTattb-SP(E)_Lpr2F-HA (descrita a continuación). Esta enzima corta en una zona común para todas las isoformas, concretamente en la región del β -propeller: His813 en el caso de *UAS-lpr2F+NCN-HA* e His716 de *UAS-SP(E)_lpr2F-HA*; y en la tercera copia del epítipo HA situado en el extremo C-terminal. De esta digestión obtenemos el transgen con una delección desde el β -propeller hasta el final de la proteína, en el vector pUASTattb con parte de la tercera copia del epítipo HA. Asimismo, digerimos con NdeI el vector pUASTattb-Lpr2F-HA-Myc (descrita anteriormente), obteniendo en este caso, desde la región del β -propeller hasta el final de la proteína (conteniendo el epítipo 6xMyc) y las dos primeras copias del epítipo HA. Subclonamos este último fragmento, que contiene

parte del transgen con el Myc en el producto de las digestiones anteriores, reconstituyéndose de esta manera el transgen completo con el nuevo epítipo 6xMyc en su ectodominio así como el epítipo 3xHA en la región C-terminal.

- Intercambio de péptidos señal entre isoformas de los receptores de lipoforinas y con Crumbs:

UAS-SP(E) *lpr2F*-HA. Para combinar el péptido señal de la isoforma Lpr2E con el resto de la secuencia codificante de la isoforma Lpr2F, se generaron los respectivos fragmentos de ADN por PCR y se combinaron en una reacción de “*overlap extension PCR*”. En concreto, se amplificó mediante PCR un fragmento correspondiente al péptido señal de la isoforma Lpr2E (Met1 hasta Ala88) a partir del clon LD1117 (BDGP). Para ello, se usó el oligo Lpr2UASFL, junto con el oligo Lpr2E_SP_R que contiene una parte con homología a la isoforma Lpr2F, concretamente los 18 pares de bases iniciales (Ser25-Leu30) del primer dominio de tipo complemento (LA2). Por otro lado, se obtuvo, también por PCR, un fragmento de la isoforma Lpr2F sin el péptido señal (desde la Ser25 hasta el extremo C-terminal) a partir del clon GH26833 (BDGP) con los oligos Lpr2F_SP_F y Lpr2FL_R. Los dos fragmentos se fusionaron mediante una reacción de PCR para generar el transgen completo, con la pareja de cebadores Lpr2UASFL y Lpr2FL_R. Se transfirió secuencialmente a los vectores pGEM®-T Easy (Promega), pAC5.1 (Invitrogen, usando un vector derivado de éste conteniendo el epítipo 3xHA en la región C-terminal) y finalmente, a pUASTattb.

UAS-SP(Crb) *lpr2F*-HA. Seguimos la misma estrategia que la construcción anterior. En este caso, para obtener el péptido señal de Crumbs (Met1 hasta Ser83) utilizamos la pareja de cebadores SP(Crb)_F y SP(Crb)_R, amplificando a partir del plásmido CrbSP (Sotillos *et al.*, 2004); y el fragmento de la isoforma Lpr2F sin péptido señal se obtuvo de la misma manera que describimos en la construcción previa. Para la reacción de “*overlap extension PCR*” se usaron los cebadores SP(Crb)_F y Lpr2FL_R.

UAS-SP(F) *lpr2E*-HA. Siguiendo la estrategia previa, obtenemos el péptido señal de la isoforma Lpr2F (Met1 hasta Ala24) a partir del vector pUASTattb-Lpr2F-HA (Parra-Peralbo and Culi, 2011), amplificando mediante PCR con los oligos Lipophorin5 y Lpr2F_SP_R, este último con homología a los 15 pares de bases (Ala90-Ala94) del dominio no conservado (NCN) de la isoforma Lpr2E. Por otro lado, se obtuvo, también por PCR, el fragmento de la isoforma Lpr2E sin el péptido señal (desde la Ala90 hasta el final de la proteína) a partir del plásmido pUASTattb-Lpr2E-HA-Myc (esta tesis) con los oligos Lpr2E_SP_F y Lpr2FL_R. En este caso, se usaron los cebadores Lipophorin5 y Lpr2FL_R para la reacción de “*overlap extension PCR*”.

- Construcción de quimeras entre los receptores de lipoforinas de *Drosophila* y las proteínas LDLR y VLDLR humanas:

UAS-*hldlr*+LA1+NCN-HA. Para la construcción de la quimera UAS-*hldlr*+LA1+NCN-HA, se obtuvieron los dominios específicos de *Drosophila* (LA1+NCN) mediante PCR a partir del clon LD1117 (BDGP) con los cebadores Lpr2UASFL y NCN_A1_R. Para la obtención del fragmento hLDLR sin el péptido señal, se amplificó por PCR a partir del vector pUASTattb-hLDLR-HA (Parra-Peralbo, no publicado) con los cebadores LDL_A1_F y arrFLUreverse2. Para conseguir el transgen completo con ambos fragmentos, se realizó una reacción de “*overlap extension PCR*”

con los cebadores Lpr2UASFL y arrFLUreverse2, siendo la región solapante los 18 pares de bases iniciales (Val23-Glu28) del primer dominio de tipo complemento (LA2) del receptor humano LDLR. A continuación, se transfirió secuencialmente al vector pSpark® I (canvax) y finalmente, al vector pUASattb.

UAS-hvldlrDLA1-HA. Digerimos con Asp718-HindIII el vector pUASTattb-*hVLDLR*-HA para obtener el receptor humano VLDLR (Parra-Peralbo, no publicado). Posteriormente, subclonamos en el vector pAC5.1 con promotor ubicuo donde realizamos una PCR inversa para que a la vez que añadimos una diana NotI, eliminemos el dominio LA1 (Cys33-Lys69) del transgen. Para ello, se usaron la pareja de cebadores hVLDLRChimF2 y hVLDLRChimRev previamente fosforilados, obteniendo pAC5.1-*hVLDLR*+LA1-HA. Seguidamente digerimos con Asp718-XbaI para obtener el transgen, el cual subclonamos en el vector pUASTattb.

- Otras construcciones:

UAS-lpr1-HA: Partiendo de moscas machos se realizó una RT-PCR usando *random primer*. La librería de ADNc obtenidas se amplificó por PCR utilizando un par de oligos específicos para las isoformas transcritas desde el promotor proximal del gen *lpr1*. Los productos de PCR obtenidos fueron directamente clonados en pGEM®-T (Promega). De los clones obtenidos, se aisló la isoforma Lpr1M mediante PCR con un par de oligos: uno específico del promotor proximal del gen *lpr1* y otro específico de la región C-terminal, siendo verificado mediante secuenciación. Al secuenciar, comprobamos que se introdujo una mutación puntual N160A->D160G en el dominio de tipo complemento LA5. A partir del dominio anterior (LA4) hasta el final de la proteína, es común a la isoforma Lpr1D, por lo tanto, para eliminarlo sustituimos la región conteniendo el error, por la misma región de la proteína Lpr1D. Para ello, se amplificó mediante PCR el fragmento perteneciente a la isoforma Lpr1M: desde el extremo amino terminal hasta el dominio LA4 (Met1-Ala117) con los oligos Lpr1FL_Asp718 y 1E8Forw2. Por otro lado, se obtuvo también por PCR el fragmento común de ambas isoformas para subsanar el error, desde Tyr109 (LA4) hasta el final de la proteína de la isoforma Lpr1D, a partir del clon RE14223 (BDGP) con los cebadores 1E8Forw_R y Lpr1UAS_LR. Debido a que los cebadores 1E8Forw2 y 1E8Forw_R son complementarios, la unión de ambos fragmentos la realizamos a través de “*overlap extension PCR*” con los cebadores Lpr1FL_Asp718 y Lpr1UAS_LR. Una vez obtenido el transgen completo clonamos secuencialmente en el vector pSpark® I, pAC5.1 modificado con un epítipo 3xHA y finalmente, en pUASTattb.

Al igual que la construcción conteniendo el Flag extracelular, este transgen fue insertado en la posición 51D (2R: en el brazo derecho del segundo cromosoma) en lugar de la posición 22A.

Peroxidasina-Myc: A partir del ADNc de la peroxidasina (clon GH13031 procedente de *Drosophila Genomics Resource Center*: DGRC) se amplificó el transgen añadiendo las dianas Asp718 y EcoRI en los extremos N y C-terminal respectivamente, usando los cebadores Pxn_Asp718_F y Pxn_EcoRI_R. Por otro lado, se amplificó la etiqueta 6xMyc a partir del vector pPMW (The *Drosophila* Gateway™ Vector Collection), añadiendo las enzimas EcoRI y XbaI con la pareja de cebadores EcoRI_Myc2_F y XbaI_Myc2_R. Ambos fragmentos fueron transferidos a pSpark® I. Tras secuenciarlos, el fragmento de la peroxidasina fue transferido al vector pAC5.1. A continuación, se insertó el epítipo 6xMyc vía EcoRI.

Todos los fragmentos obtenidos por PCR fueron secuenciados para evitar la introducción de mutaciones no deseadas.

Los cebadores utilizados en la realización de las construcciones se detallan en el apartado 7.2. Las enzimas de restricción están resaltadas en rojo.

Las moscas transgénicas se obtuvieron mediante el sistema basado en la integrasa phiC31 (Bischof *et al.*, 2007). Este método permite que la integración de los transgenes tenga lugar en la misma localización cromosómica, minimizando los efectos que puedan tener sobre la transcripción el lugar en que se produzca la inserción. Todos los transgenes UAS usados en este trabajo fueron insertados en el sitio **22A** (2L: en el brazo izquierdo del segundo cromosoma), salvo excepciones indicadas en cada caso. Las moscas transgénicas fueron generadas en el Servicio de Microinyección de *Drosophila* “Consolider-Ingenio 2010 GESHAPE”.

6. TAMPONES

Actividad β -galactosidasa

Tampón Z
0.1 M NaH_2PO_4
10 mM KCl
2 mM MgSO_4
50 mM 2-mercaptoetanol

Solución de Stop

1M Na_2CO_3

ONPG (4 mg/ml)

Co-Inmunoprecipitación

Tampón de lavado
150 mM NaCl
20 mM Tris HCl, pH 7,8
0,5% Tritón X100

PBTween
1X PBS
0.1% (v/v) Tween 20

Solución de bloqueo
PBTween
5% (v/v) leche desnatada

Tampón de Laemmli 2X (LB2X)
4% SDS
20% Glicerol
10% 2-mercaptoetanol
0.004% Azul de bromofenol
0.125M Tris HCl, pH 6.8

Tampón de lisis
150 mM NaCl
20 mM Tris HCl, pH 7,8
0,5% Tritón X100
Inhibidores (añadir antes de usar):
1mM DTT
0,5 mM PMSF
1x Roche protease inhibitor cocktail

Solución de STRIPPING

100 mM 2-Mercaptoetanol
2% SDS
62.5 mM Tris-HCl pH 6.7

PBS 10X
18.6 mM NaH_2PO_4
84.1 mM Na_2HPO_4
1.75 M NaCl

Para los ensayos de Co-IP de la lipoforina, al tampón de lavado y de lisis se le añadieron 1 mM de DTT y 2,5 mM de CaCl_2 , ya que se ha descrito que la interacción de varios miembros de la familia LDLR con sus ligandos es dependiente de Ca^{2+} (Ren *et al.*, 2010).

7. TABLAS

7.1. Anticuerpos

Anticuerpo (α -)	[Inmunotinción]	[Western blot]	Animal	Procedencia
AP50	1:50	-	Ratón	BD Bioscience
aPKC ζ C-20	-	1:5000	Conejo	Santa Cruz Biotechnology
ApoLp FL (Lp)	1:500	1:2500	Conejo	Laboratorio
ApoLP-II	-	1:20000	Conejo	Laboratorio
ApoLTP-I	1:1000	-	Conejo	Palm <i>et al.</i> , 2012
ApoLTP-II	-	1:1000	Conejo	Palm <i>et al.</i> , 2012
Boca	1:500	-	Cobaya	Culi and Mann, 2003
Casp3 activada	1:50	-	Conejo	Cell Signaling Technology
CBP	-	1:500	Cabra	Santa Cruz Biotechnology
Flag	1:50	1:5000	Ratón	Sigma
GFP	1:300	-	Conejo	Sigma
GFP	1:500	-	Pollo	Abcam
GFP	-	1:2000	Ratón	Sigma
Golgi	1:100	-	Ratón	Calbiochem
HA	1:500	1:2500	Rata	Roche
HA	1:25	1:250	Ratón	Santa Cruz Biotechnology
Hrs	1:500	-	Ratón	Lloyd <i>et al.</i> , 2002
Lpr1	1:100	-	Cobaya	Parra-Peralbo and Culi, 2011
Lpr2	1:100	-	Cobaya	Parra-Peralbo and Culi, 2011
Myc	1:100	-	Conejo	Sigma
Myc (9E10)	1:50	1:100	Ratón	Hibridoma Bank
Rab11	1:100	-	Ratón	BD Bioscience
Rab8	1:100	-	Ratón	BD Bioscience
DAPI	1:500	-	-	Molecular Probes
Faloidina-Rodamina	1:100	-	-	Sigma
Anticuerpos conjugados con HRP	-	1:25000	Ratón, Conejo, Rata, Cobaya y Cabra	Thermo Fisher Scientific
Clean Blot	-	1:100	Ratón, Conejo, Rata, Cabra, Oveja, Bovino y Humano	Thermo Fisher Scientific

En gris se muestran los colorantes y anticuerpos secundarios.

7.2. Cebadores

NOMBRE DEL CEBADOR	SECUENCIA (5' => 3')
1E8Forw_R	ACCTGTTACACGGATGAATATGC
1E8Forw2	AGTCCTTGCTCTGGTCGCACAT
arruFLUreverse2	TCTAGACTACACCATGCTAGCGTAATCT
EcoRI_Myc2_F	GAATTC AGAAGCTCCGCCACCATG
hVLDLRChimF2	CCCGA AAGACGTGTGCTGAATCTG
hVLDLRChimRev	CCGCT TTTGGCTTTTCTCCCGTT
LDL_A1_F	GTGGGCGACAGATGTGAAAGAAAC
Lipophorin5	GGTACC AACATGGGACCAATATGCC
LpNotGTM_F	CCGC AGATCTGGGTATCCCAACTG
Lpr1FL_Asp718	GGTACC GGAAAATGGGGCGCA
Lpr1UAS_LR	AAGCTT ATACGAGGATATGCCTATGAC
Lpr2E_SP_F	GCGGTAAATGCCGCCCATGT
Lpr2E_SP_R	CAATCCGACGACTCTGGACGCCGCATTGCAGAATTG
Lpr2Eflag_F	TACAAGGACGATGATGACTACAGCGGATCGGGCGCTG
Lpr2Eflag_R	GTCATCATCGTCCTTGTAGTCCAGATTGTGCATTATCTCGCT
Lpr2F_SP_F	TCCAGAGTCGTCGGATTGGAATC
Lpr2F_SP_R	GGCGGCATTTACCGCGGCATGGTGCGG
Lpr2Fflag_F	TACAAGGACGATGATGACTACGAATCAACTTGCAGCCAG
Lpr2Fflag_R	GTCATCATCGTCCTTGTAGTCCAATCCGACGACTCTGGA
Lpr2FL_R	AAGCTT AACACATTCCGGTGCCAGATTGAAG
Lpr2Myc_R	CCGCTTCGACGCACATTAGCCCGT
Lpr2UASFL	GGTACC AAAGATGGCCACAACCTGC
Myc_Not_F	GCGGCCGC TCGATCGAAAGCTATGGAGCAA
Myc_Not_R	GCGGCCGC GAGAGGCCTTGAATTCAAGTC
NCN_A1_R	TTCACATCTGTGCCCACTGTAAACTTGCACTCCTCCAG
Pxn_Asp718_F	GGTACC AAAATGCGATTTATGCTGCTCAT
Pxn_EcoRI_R	GAATTC CTTGACCATCGGGCAGT
SP(Crb)_F	GGTACC AACATGGCTAAAATCGCCAATG
SP(Crb)_R	CAATCCGACGACTCTGGATGAGGCGACATCTGTTGC
XbaI_Myc2_R	TCTAGA ACAACTTGTATACCGGTGATTC

Enzimas de restricción:

Asp718: **GGTACC**

XbaI: **TCTAGA**

EcoRI: **GAATTC**

HindIII: **AAGCTT**

NotI: **GCGGCCGC**

7.3. ADNc

ADNc

pUASattb-Lpr2E-HA

pUASattb-Lpr2F-HA

pUASattb-Lpr2E-HA-Myc

pUASattb-Lpr2F-HA-Myc

pUASattb-Lpr2F+LA1-HA

pUASattb-Lpr2F+LA1+ED-HA

pUASattb-Lpr2F+LA1+NCN-HA

pUASattb-Lpr2F+NCN-HA

pUASattb-hLDLR-HA

pUASattb-hLDLR+LA1+NCN-HA

pUASattb-hVLDLR-HA

pUASattb-hVLDLR Δ LA1-HA

pAC5.1-Peroxidasina-Myc

$$\frac{FB_{calc} \times LpR2E_{flag}}{LpR2F_{flag}}$$

RESULTADOS

$$\begin{aligned} & \gamma_{wfp}; UBS \cdot LpR2E_{flag} \\ & \text{"} \text{"} LpR2F_{flag} \times MD638 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \gamma_{wfp}; UBS \cdot LpR2E_{flag} \\ & \text{"} \text{"} LpR2F_{flag} \times elaw_{calc} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \gamma_{wfp}; UBS \cdot LpR2F_{flag} \times \\ & \text{"} \text{"} LpR2E_{flag} \times \frac{\Delta p_{calc}}{C_{EO}}; \frac{UBS - \gamma}{Tm2} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & UBS \cdot attb \cdot LpR2F - A1 - HA \times \gamma_{w MD638} \\ & \text{"} \text{"} \text{"} \text{"} \text{"} \times \frac{\Delta p_{calc}}{C_{EO}}; \frac{UBS - \gamma}{Tm2} \end{aligned}$$

$$\gamma_{wfp}; UBS \cdot LpR2F + CD1 - HA \times \frac{\Delta p_{calc}}{C_{EO}}; \frac{UBS - \gamma}{Tm2}$$

$$\begin{aligned} & \gamma_{wfp}; UBS \cdot LpR2E - HA \times \\ & \text{"} \text{"} LpR2F - HA \times \frac{\Delta p_{calc}}{C_{EO}}; \frac{UBS - \gamma}{Tm2} \end{aligned}$$

1. Efecto de los distintos dominios proteicos de los receptores de lipoforinas sobre su distribución subcelular en discos imaginales

Como hemos descrito en la introducción, existen múltiples isoformas de los receptores de lipoforinas generadas por *splicing* alternativo y también por el uso de dos promotores distintos. Sin embargo, todas ellas son muy parecidas estructuralmente. A pesar de esta similitud, observamos que cuando sobre-expresamos en el compartimento dorsal de los discos imaginales de ala con el activador *apterous-Gal4* (*ap-Gal4*) las isoformas *UAS-lpr2E-HA* y *UAS-lpr2F-HA*, transcritas en el genoma a partir del promotor distal y proximal respectivamente, su distribución subcelular en el epitelio es muy diferente, tal como se observa en la Figura 25.

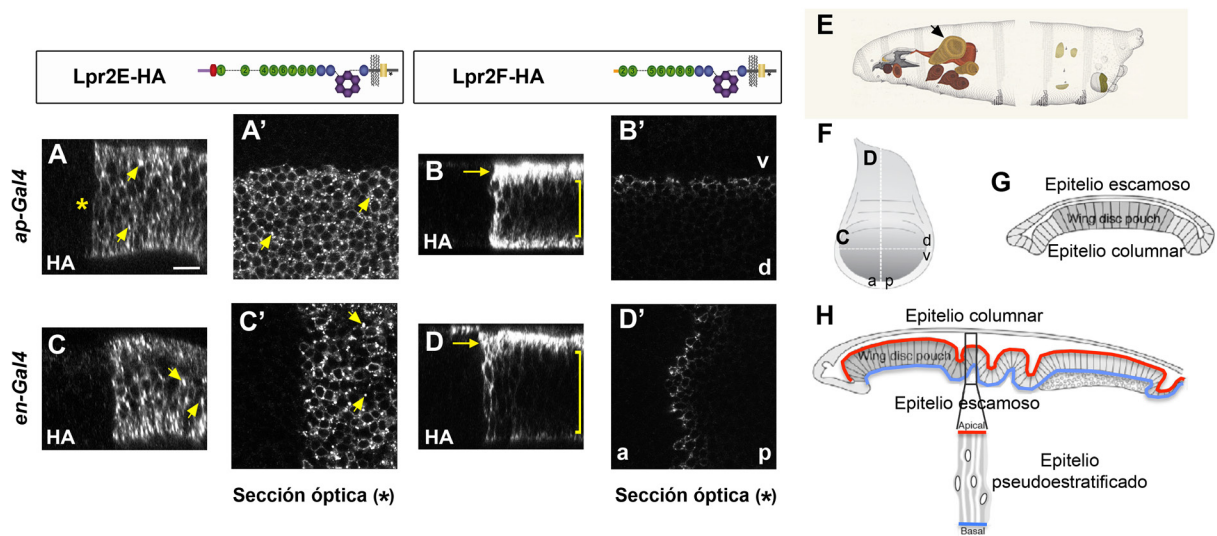


Figura 25. Distribución de los receptores de lipoforinas en discos imaginales de ala. Discos de ala en los que se han sobre-expresado las isoformas Lpr2E (A y C) y Lpr2F (B y D) en el compartimento dorsal o posterior mediante las líneas activadoras *ap-Gal4* y *en-Gal4* respectivamente. Se muestra un corte en el eje apico-basal (A-D) y transversal (A'-D'). La posición de los planos transversales mostrados se marca con un asterisco en A. La distribución del receptor se ha detectado mediante α -HA. Lpr2E se acumula en múltiples vesículas (flechas en A-A' y C-C'). Lpr2F se acumula en la región apical del disco (flecha en B y D). La llave muestra el Efecto borde. Barra de escala: 10 μ m. Todos los paneles se muestran al mismo aumento. (E) Dibujo de una larva de *Drosophila* en el tercer estadio larvario mostrando los distintos discos imaginales. La flecha señala el disco imaginal de ala. Tomada de Flybase. (F) Esquema en el eje x-y del disco imaginal de ala donde se indican los cortes transversales en el eje x-z (G-H). El primordio del ala está marcado en gris. v: ventral, d: dorsal, a: anterior, p: posterior Tomada y modificada de Windmann and Dahmann, 2009.

La isoforma Lpr2E se distribuye homogéneamente en el citoplasma de las células que lo expresan, con una ligera mayor acumulación en un dominio apical y en vesículas (Figura 25A y A'). En el caso de la isoforma Lpr2F, observamos que se acumula fundamentalmente en la región más apical y basal de las células y es casi indetectable en el citoplasma a niveles intermedios del eje apico-basal. Además, no se observa en vesículas (Figura 25B y B'). Sorprendentemente, esta distribución es distinta en las células situadas en el borde del territorio

RESULTADOS

de expresión, en las que también se observa Lpr2F en el citoplasma en posiciones intermedias en el eje apico-basal al igual que en vesículas (Figura 25B y B'). A partir de ahora, para facilitar la comprensión de los resultados obtenidos, denominaremos a la diferente distribución de la isoforma Lpr2F en las células situadas en el borde de expresión respecto a las centrales como **Efecto Borde**. Es importante señalar que observamos esta diferente distribución utilizando otras líneas activadoras tales como *engrailed-Gal4* (*en-Gal4*) (Figura 25C y D).

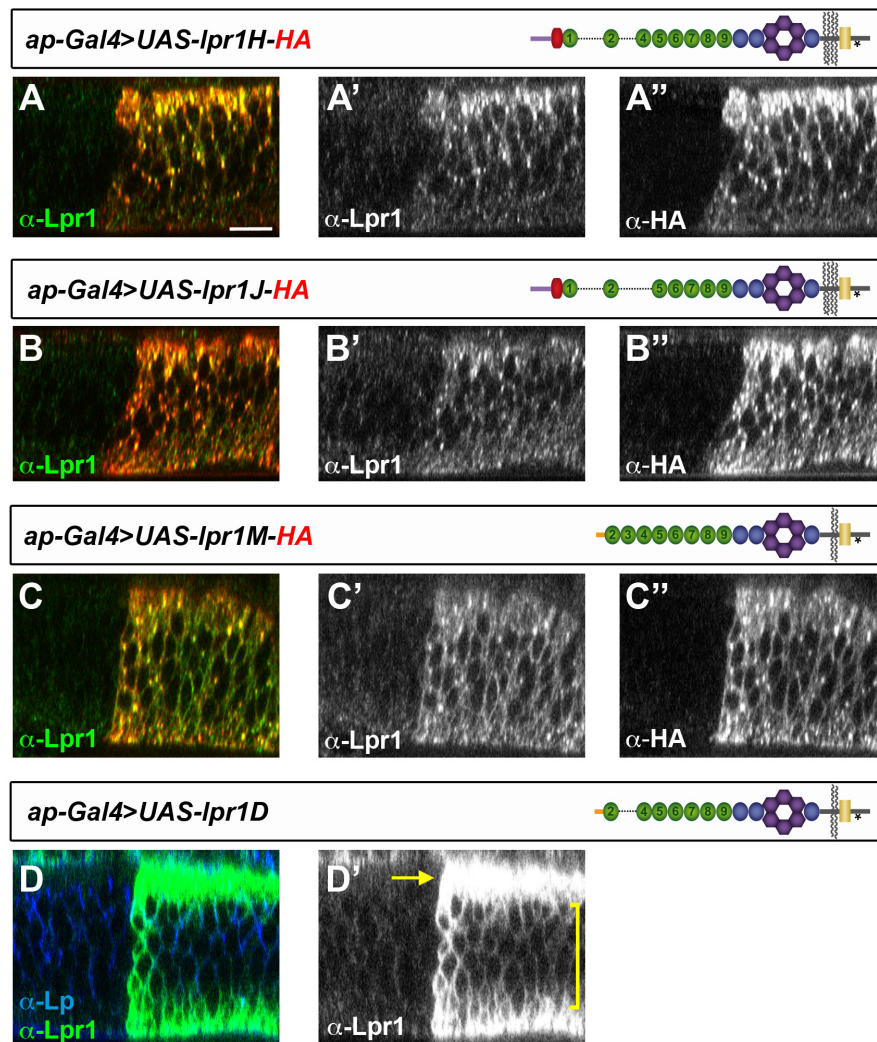


Figura 26. Distribución de los receptores de lipoforinas 1 (Lpr1) en discos imaginales de ala. Secciones transversales de discos imaginales de ala en los que se sobre-expresan en el compartimento dorsal las isoformas Lpr1H (A), Lpr1J (B), Lpr1M (C) y Lpr1D (D). La distribución del receptor se ha detectado con el anticuerpo específico α -Lpr1 en verde y α -HA en rojo, mostrados en canales desglosados excepto para la isoforma Lpr1D. La isoforma Lpr1D sólo se detectó con α -Lpr1 y también se muestra la distribución de lipoforinas con α -Lp en azul, marcando los contornos celulares. La flecha señala la región apical y la llave el Efecto borde (D). Barra de escala: 10 μ m. Todos los paneles se muestran al mismo aumento.

Al observar estas diferencias en la distribución de la proteína de las isoformas de *lpr2*, nos preguntamos si ocurriría lo mismo con las isoformas del gen *lpr1*. Para ello, expresamos ectópicamente en el compartimento dorsal de discos imaginales de ala isoformas transcritas

desde el promotor distal Lpr1H y Lpr1J, e isoformas transcritas desde el promotor proximal Lpr1M y Lpr1D. Podemos observar como las isoformas Lpr1H, Lpr1J y Lpr1M tienen una distribución muy similar a Lpr2E, acumulándose en todo el citoplasma de las células y presentando gran cantidad de vesículas (Figura 26A-C). Por el contrario, la isoforma Lpr1D se distribuye de forma muy semejante a la Lpr2F ya que se acumula principalmente en una región apical y basal y no se observa en vesículas (Figura 26D-D', flecha). Además, observamos el Efecto borde (Figura 26D-D', llave).

Por tanto, vemos que como en el caso de las isoformas de *lpr2*, también las de *lpr1* muestran distintos patrones de acumulación subcelular al ser expresadas en el disco imaginal de ala.

1.1. Estudio con marcadores de compartimentos subcelulares

Las diferencias de distribución celular que encontramos entre la isoforma Lpr2E y Lpr2F, pueden ser debidas a que se acumulan en compartimentos subcelulares distintos, tales como el Golgi o vesículas de reciclaje. Por ello, examinamos la co-localización de estas isoformas con distintos marcadores subcelulares de la vía secretora y endocítica (Figura 27A).

Abordamos este estudio con dos aproximaciones distintas, sobre-expresando los receptores en discos imaginales de ala y en células Schneider (S2) de *Drosophila*.

En primer lugar, examinamos ambas vías en discos imaginales de ala sobre-expresando las isoformas Lpr2E y Lpr2F en el compartimento posterior. Para el análisis de la **vía secretora**, utilizamos la línea *sqh-EYFP-RE*, en la que la secuencia EYFP está flanqueada en su extremo 5' por el péptido señal de la proteína calreticulina y en su extremo 3' por la secuencia de reconocimiento KDEL marcando por tanto el retículo endoplasmático (RE), y un anticuerpo específico para el aparato de Golgi. Podemos apreciar como tanto Lpr2E como Lpr2F co-localizan parcialmente con el marcador de retículo endoplasmático, particularmente en la zona apical (Figura 27B-B'' y C-C''). Por otro lado, vemos que una alta proporción de vesículas de Golgi co-localizan con los receptores de lipoforinas, no apreciándose una diferencia significativa entre Lpr2E y Lpr2F (Figura 27D-D'' y E-E''). Esto ocurre en todas las regiones del disco (apical, intermedia y basal, indicado con flechas blancas) si bien la mayor parte de vesículas de Golgi son apicales.

Seguidamente, analizamos algunos de los compartimentos más importantes de la **vía endocítica**, tales como, vesículas a nivel de membrana (anti-AP50), endosomas tempranos (Rab5-GFP) y lisosomas (LAMP1-GFP). Al examinar con AP-2 las vesículas a nivel de membrana procedentes de la endocitosis dependiente de clatrina, observamos como ninguna de las dos isoformas se acumulan en estas vesículas de forma apreciable (Figura 27F-F'' y G-G''). Por otra parte, al sobre-expresar Rab5-GFP, detectamos la presencia de vesículas de gran tamaño, muchas de ella co-localizan con el receptor de lipoforinas (Figura 27H-H'' e I-I'', flechas). Estos resultados de co-localización con Rab5-GFP hay que tomarlos con cierta precaución, ya que la sobre-expresión de *UAS-rab5-GFP* por si misma altera el tráfico vesicular normal, aumentando los niveles de endocitosis. Finalmente, mediante la expresión de *UAS-lamp1-GFP* (Figura 27J-J'' y K-K''), marcamos los lisosomas. Observamos que tanto Lpr2E como Lpr2F co-localizan parcialmente y de forma parecida con LAMP1, tanto en la zona apical como la basal del epitelio.

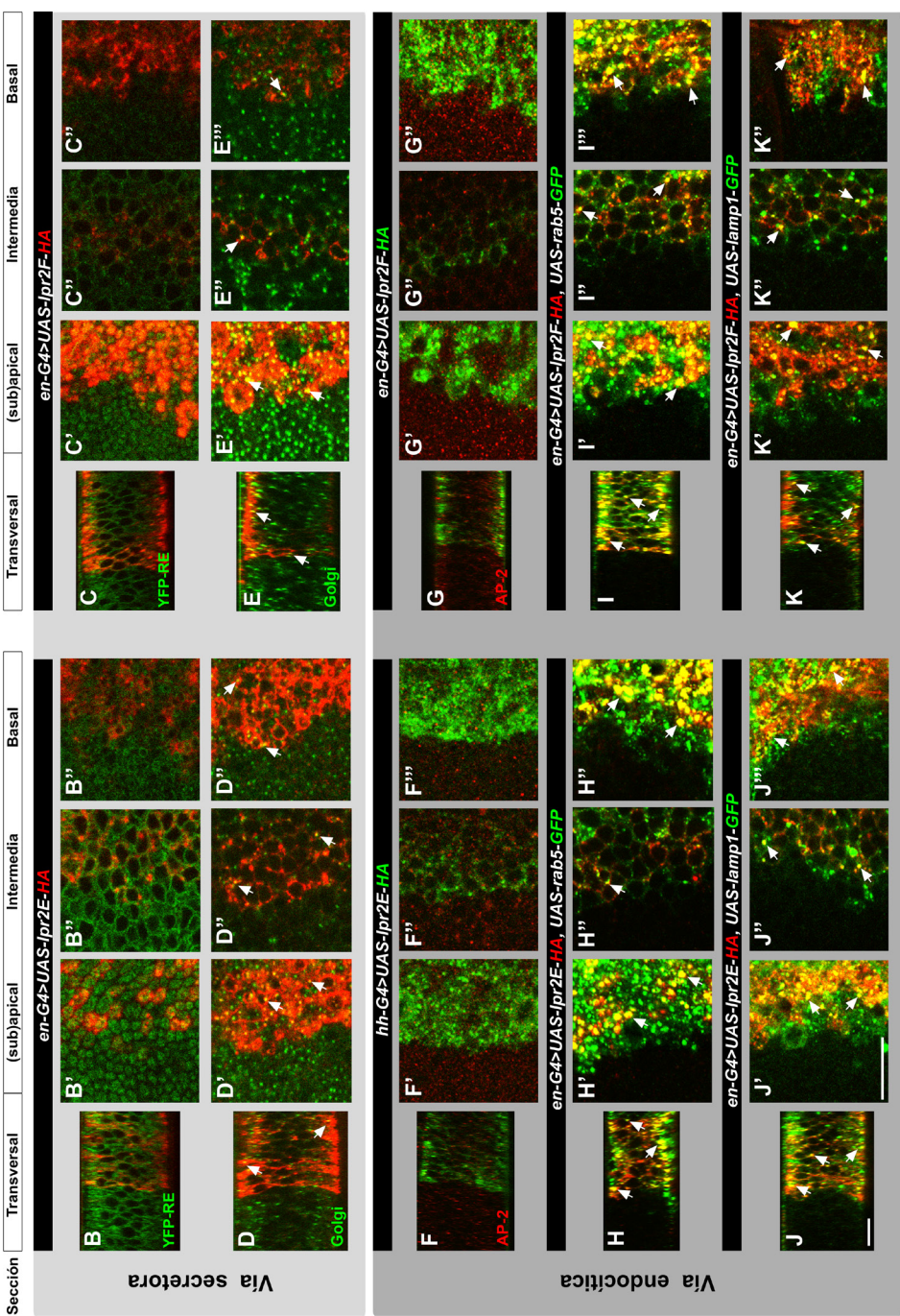


Figura 27. Las distintas isoformas de los receptores de lipoforinas siguen la misma ruta secretora y endocítica en discos imaginales de ala. (A) Las proteínas secretables son sintetizadas en el retículo endoplasmático (RE), pasan al aparato de Golgi y TGN donde maduran. De ahí, a través de vesículas secretoras van hacia la membrana donde son liberadas al exterior mediante un proceso de exocitosis. Por otra parte, partículas u otras proteínas pueden ser endocitadas, pasando a endosomas tempranos. A partir de aquí pueden pasar a cuerpos multivesiculares o MVB, endosomas tardíos y finalmente, a lisosomas para ser procesados por la célula, o volver al exterior mediante endosomas de reciclaje. Ambas rutas o vías no son independientes y pueden conectarse entre sí. (B-K) Sobre-expresión de Lpr2E o Lpr2F en el compartimento posterior de discos imaginales de ala. La distribución del receptor se ha detectado con α -HA en rojo (salvo F-F''' y G-G''' en verde) y los anticuerpos específicos para los compartimentos o endosomas correspondientes a la vía secretora (B-E) o endocítica (F-K) en verde (salvo F-F''' y G-G''' en rojo). Todos los paneles se muestran al mismo aumento. Barra de escala: 10 μ m.

son sintetizadas en el retículo endoplasmático (RE), pasan al aparato de Golgi y TGN donde maduran. De ahí, a través de vesículas secretoras van hacia la membrana donde son liberadas al exterior mediante un proceso de exocitosis. Por otra parte, partículas u otras proteínas pueden ser endocitadas, pasando a endosomas tempranos. A partir de aquí pueden pasar a cuerpos multivesiculares o MVB, endosomas tardíos y finalmente, a lisosomas para ser procesados por la célula, o volver al exterior mediante endosomas de reciclaje. Ambas rutas o vías no son independientes y pueden conectarse entre sí. (B-K) Sobre-expresión de Lpr2E o Lpr2F en el compartimento posterior de discos imaginales de ala. La distribución del receptor se ha detectado con α -HA en rojo (salvo F-F''' y G-G''' en verde) y los anticuerpos específicos para los compartimentos o endosomas correspondientes a la vía secretora (B-E) o endocítica (F-K) en verde (salvo F-F''' y G-G''' en rojo). Todos los paneles se muestran al mismo aumento. Barra de escala: 10 μ m.

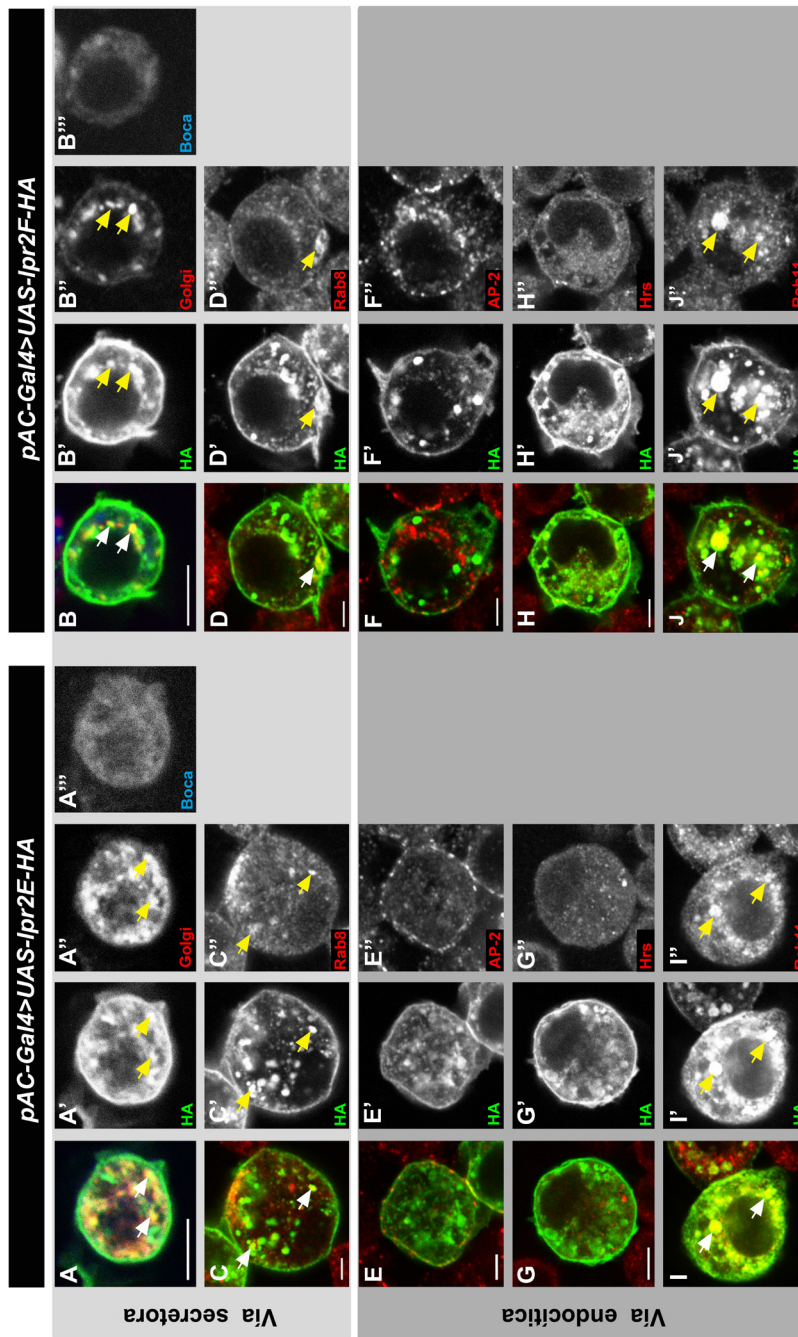


Figura 28. No existen diferencias en la vía secretora o endocítica que siguen los receptores de lipoforinas cuando se expresan en células S2. (A-J) Expresión de Lpr2E o Lpr2F en células S2. La distribución del receptor se ha detectado con α -HA en verde y los anticuerpos específicos para los compartimentos o endosomas correspondientes a la vía secretora (A-D) o endocítica (E-J) en rojo y azul. Todos ellos se mostraron en un canal desglosado en gris. Barra de escala: 100 μ m.

Este análisis nos indica que tanto Lpr2E como Lpr2F se acumulan débilmente en el RE y a mayores niveles en el aparato de Golgi. Respecto a la vía endocítica, observamos ambas isoformas en endosomas Rab5 y en lisosomas. Por tanto, la mayor acumulación de proteína Lpr2F en la zona apical de las células respecto a Lpr2E puede deberse a la acumulación de Lpr2F en un compartimento celular que no hayamos analizado, tal vez la membrana plasmática (ver más adelante).

En segundo lugar, llevamos a cabo este análisis en células S2 transfectadas con los transgenes *UAS-lpr2E-HA* y *UAS-lpr2F-HA* (ver en el apartado 3 de Métodos). Ya se había observado que los receptores de lipoforinas se localizan fundamentalmente en la membrana plasmática y en vesículas (Culi and Mann, 2003). Al analizar la **vía secretora** con anticuerpos específicos para el Golgi y la chaperona Boca, residente del RE, observamos como algunas de las vesículas co-

localizan con el Golgi (Figura 28A-A'' y B-B'', flechas), asimismo, utilizamos el anticuerpo frente a Rab8, un marcador de vesículas secretoras que circulan desde la red trans-golgi o TGN (del inglés, *Trans-Golgi Network*) hasta la membrana plasmática (Huber *et al.*, 1993), observamos co-localización con ambas isoformas (Figura 28C-C'' y D-D''). Del mismo modo, estudiamos la **vía endocítica**. Detectamos las vesículas endocíticas tempranas a nivel de membrana mediante un anticuerpo anti-AP50 (Figura 28E-E'' y F-F''). Observamos como al igual que en discos imaginales de ala, no existe co-localización con ninguna de las dos isoformas. Detectamos los cuerpos multivesiculares o MVB (del inglés, *MultiVesicular Body*), con el anticuerpo específico anti-Hrs, una proteína reguladora de estas vesículas (Lloyd *et al.*, 2002). No observamos co-localización de los receptores de lipoforinas con Hrs (Figura 28G-G'' y H-H''). Por último, analizamos el reciclaje de los receptores de lipoforinas utilizando el anticuerpo anti-Rab11. En la Figura 28I-I'' y J-J'', se muestra como en algunas vesículas co-localizan con Rab11 y los receptores de lipoforinas.

Todos estos resultados indican que tanto Lpr2E como Lpr2F siguen una ruta secretora vía RE-Golgi-Rab8 hasta la membrana plasmática, donde se acumulan fundamentalmente para ejercer su función. Según las inmunotinciones en discos imaginales de ala, en la zona apical se concentra la mayor síntesis de estas proteínas, ya que vemos una mayor co-localización tanto con retículo como con Golgi. Una vez en membrana, ambas isoformas pueden ser endocitadas. La falta de co-localización con AP-2 podría sugerir una vía independiente de clatrina (Pearse *et al.*, 2000 y Raiborg *et al.*, 2001). Tras endocitarse, pasan a endosomas tempranos (Rab5), acumulándose preferencialmente en las zonas apical y basal. Por último, observamos como el receptor pasa al lisosoma (LAMP1) y/o se recicla (Rab11).

Con los marcadores utilizados en este estudio, no observamos ninguna diferencia significativa entre la distribución de Lpr2E y Lpr2F en las vías endocítica y secretora.

1.2. Estudio de los dominios proteicos implicados en la distribución subcelular diferencial entre las distintas isoformas de los receptores de lipoforinas

Hemos descrito como varias isoformas de los receptores de lipoforinas muestran una distribución subcelular en el disco imaginal de ala al inducir su expresión a partir de transgenes aparentemente muy distinta. Ello podría tener consecuencias funcionales, tal vez relacionadas con el proceso de adquisición de lípidos. Por ello, decidimos caracterizar en detalle los dominios proteicos responsables de esta distinta localización y ver si estaban también relacionados con las distintas capacidades de las isoformas de los receptores de lipoforinas en mediar la adquisición de lípidos. Este estudio se realizó mediante experimentos de sobre-expresión debido a que técnicamente no es posible distinguir las distintas isoformas en los genes endógenos. Nos hemos centrado en el estudio de las isoformas del gen *lpr2* debido a su mayor relevancia en el proceso de adquisición de lípidos neutros en discos imaginales de ala y ovarios (Parra-Peralbo and Culi., 2011).

Tanto la isoforma Lpr2E como Lpr2F son muy parecidas estructuralmente en cuanto a composición de dominios proteicos se refiere. Las principales diferencias entre ambas se concentran en la región N-terminal, donde existen varios dominios en Lpr2E que están ausentes en Lpr2F. Estos dominios son el módulo LA1, el dominio NCN (del inglés *Non-Conserved*

N-terminal domain), y el péptido señal (SP, del inglés *Signal Peptide*) (Figura 29A). Por tanto, es probable que uno o varios de estos dominios sean los responsables de las diferencias en la distribución subcelular observadas. De todos ellos, sólo al módulo LA1 se le ha podido asignar una función, siendo imprescindible para la adquisición de lípidos tanto en discos imaginales de ala como en ovarios (Parra-Peralbo and Culi, 2011). Cabe destacar que el dominio NCN, a pesar de carecer de homología con otras proteínas, tiene una pequeña zona conservada entre diversas especies de dípteros correspondiente a los 16 aminoácidos más cercanos al dominio LA1, esta región la denominamos ED (del inglés *Extension Domain*) (Figura 29A).

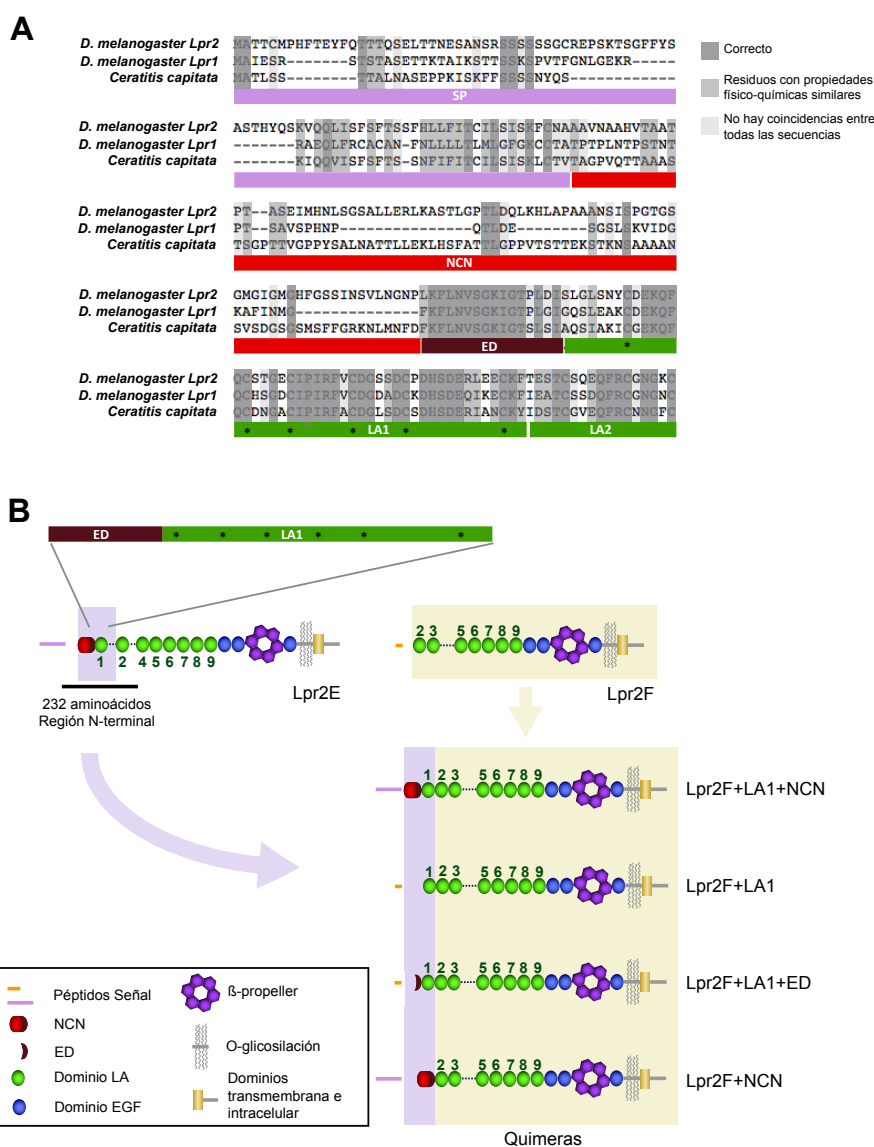


Figura 29. Dominios proteicos de Lpr2E. (A) Alineamiento de la región N-terminal de los receptores de lipoforinas procedentes de *Drosophila melanogaster* y *Ceratitis capitata*. El dominio LA1, resaltado con una barra verde, está altamente conservado. Este dominio contiene 6 cisteínas marcadas con asteriscos, los cuales forman característicos puentes disulfuros. La conservación se extiende hasta 16 aminoácidos adicionales de esta región, a la cual denominaremos dominio extendido (ED), resaltado con una barra marrón. El resto del dominio NCN está marcado con una barra roja y el péptido señal en lila. Los residuos conservados están sombreados según su conservación (B) Esquema modular de la composición de las isoformas Lpr2E, Lpr2F y los receptores quiméricos obtenidos al intercambiar dominios y usados a lo largo de esta tesis.

Por otra parte, es interesante recalcar que el péptido señal de las isoformas transcritas desde el promotor distal, como Lpr2E, es atípicamente largo, de 88 aminoácidos según las predicciones del software SignalP 4.1 (Bendtsen *et al.*, 2004) y PrediSi (Hiller *et al.*, 2004), mientras que las isoformas transcritas desde el promotor proximal, como Lpr2F, poseen péptidos señal típicos de 24 aminoácidos. En el caso del gen *lpr1*, el péptido señal de las isoformas transcritas desde el promotor distal tales como Lpr1H y/o Lpr1J es también atípicamente largo, de 68 aminoácidos, y las transcritas desde el promotor proximal (Lpr1D) es típico de 20 aminoácidos. Para examinar cuál de estos dominios es el responsable de las diferencias en la distribución de las distintas isoformas de lipoforinas, utilizamos diferentes formas quiméricas de los receptores construidas artificialmente mediante intercambio de dominios. Concretamente, a la isoforma Lpr2F se le añadieron los distintos dominios específicos de la isoforma Lpr2E (Figura 29B). Estas quimeras se sobre-expresaron en discos imaginales de ala en el compartimento posterior o en el compartimento dorsal, utilizando la línea activadora *en-Gal4* o *ap-Gal4* respectivamente, y se compararon con las isoformas Lpr2E y Lpr2F.

Tal y como se observa en la Figura 30, las quimeras obtenidas al añadir el dominio LA1 (Figura 30C-C'') o LA1+ED (Figura 30D-D'') a Lpr2F se distribuyen de forma similar a Lpr2F (Figura 30B-B''), sugiriendo que estos dominios no afectan a la distribución subcelular de estas proteínas. Sin embargo, la quimera que contiene la región N-terminal de Lpr2E completa fusionada a Lpr2F, LA1+NCN (Figura 30E-E''), se distribuye de forma parecida a la isoforma Lpr2E (Figura 30A-A''), indicando que efectivamente, la región N-terminal es decisiva para definir los distintos patrones de acumulación. Para acotar más los dominios relevantes, analizamos una quimera adicional que contiene los dominios NCN y el péptido señal de Lpr2E fusionados a Lpr2F (Figura 30F-F''). Observamos que éstos eran suficiente para cambiar el patrón de distribución ya que esta quimera se acumula en todo el citoplasma a lo largo del eje apico-basal de forma semejante a Lpr2E (Figura 30A-A''). Para continuar acotando los dominios requeridos, nos llamó la atención que el péptido señal de Lpr2E, y otras isoformas sintetizadas a partir del promotor distal, fuera atípicamente largo. Por ello nos preguntamos si el péptido señal podía influir en la distribución diferencial de estas isoformas. En esta dirección, generamos un transgen reemplazando el péptido señal de la isoforma Lpr2F por el péptido señal atípicamente largo de la isoforma Lpr2E, obteniendo *UAS-SP(E)_lpr2F-HA*. Al sobre-expresar esta quimera en el compartimento dorsal del disco imaginal de ala usando la línea activadora *ap-Gal4* observamos que se distribuía de forma similar a Lpr2E (Figura 31A-A''). Por tanto, estos resultados indicaban que el péptido señal desempeñaba un papel importante en definir la localización subcelular de las isoformas de *lpr2*.

Como se ha comentado en la introducción, algunos péptidos señal atípicos desempeñan funciones una vez procesados y pueden afectar las propiedades de la célula. Por tanto, quisimos analizar si el péptido señal atípico de Lpr2E podría ser sustituido por otro péptido señal atípicamente largo. Para ello generamos un nuevo transgen siguiendo la estrategia anterior, pero en este caso, reemplazando el péptido señal de Lpr2F por el único péptido señal largo bien caracterizado hasta ahora en *Drosophila*, el péptido señal de la proteína Crumbs (Kilic *et al.*, 2010), siendo ésta una proteína transmembrana que desempeña funciones principales en polaridad celular y morfogénesis (Pocha and Knust, 2013). Cuando expresamos de manera ectópica el transgen *UAS-SP(Crb)_lpr2F-HA* en discos de ala, observamos como la distribución de la proteína a lo largo del disco era similar a la de Lpr2F a pesar de la presencia del péptido señal largo (Figura 31B-B''). Por tanto, el péptido señal largo de Lpr2E tienen propiedades que no comparten otros péptidos señal atípicos, como el de la proteína Crumbs.

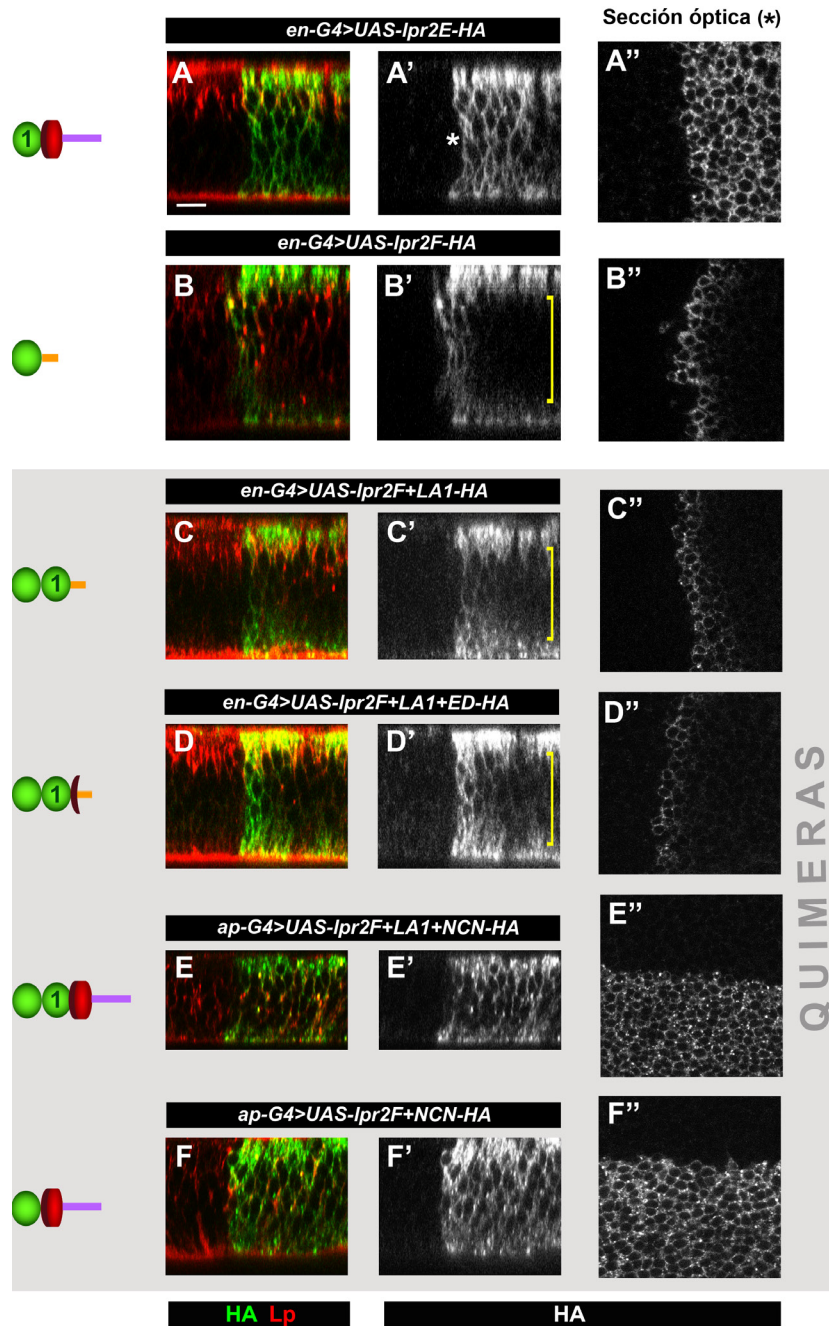


Figura 30. El dominio N-terminal define la distribución de las distintas isoformas. (A-F) Sección transversal de discos imaginales de ala con la parte apical arriba y la basal abajo en los que se han sobre-expresado diferentes quimeras en el compartimento posterior (*en-Gal4*) o dorsal (*ap-Gal4*). Los dominios proteicos relevantes de las quimeras expresadas ectópicamente están representadas a la izquierda de la figura. El asterisco muestra la zona donde se tomó la sección óptica, que se presenta en un canal desglosado en gris. Las llaves indican la zona intermedia con bajos niveles de tinción. La detección del receptor se realizó con α -HA en verde y se muestra también en un canal desglosado en gris. La distribución de lipoforinas con α -Lp en rojo, marcando los contornos celulares. Las quimeras Lpr2F+LA1-HA (C-C'') y Lpr2F+LA1+ED-HA (D-D'') se distribuyen de manera parecida a Lpr2F, sin embargo, las quimeras Lpr2F+LA1+NCN-HA (E-E'') y Lpr2F+NCN-HA (F-F'') se distribuyen de manera parecida a Lpr2E, siendo el dominio NCN junto con el péptido señal los responsables de la diferencia en distribución de la proteína. Barra de escala: 10 μ m. Todos los paneles se muestran al mismo aumento.

De esta manera, nuestros datos sugieren que el péptido señal atípico de Lpr2E se requiere para la distribución subcelular correcta de esta isoforma. Si ello es así, al sustituir su péptido señal largo por el péptido señal de la isoforma Lpr2F esperaríamos que su distribución cambiara y fuera más parecida a la de Lpr2F. Generamos esa nueva quimera, *UAS-SP(F)_lpr2E-HA*, y tal como se esperaba, la proteína se distribuye de forma parecida a Lpr2F (Figura 31C-C”).

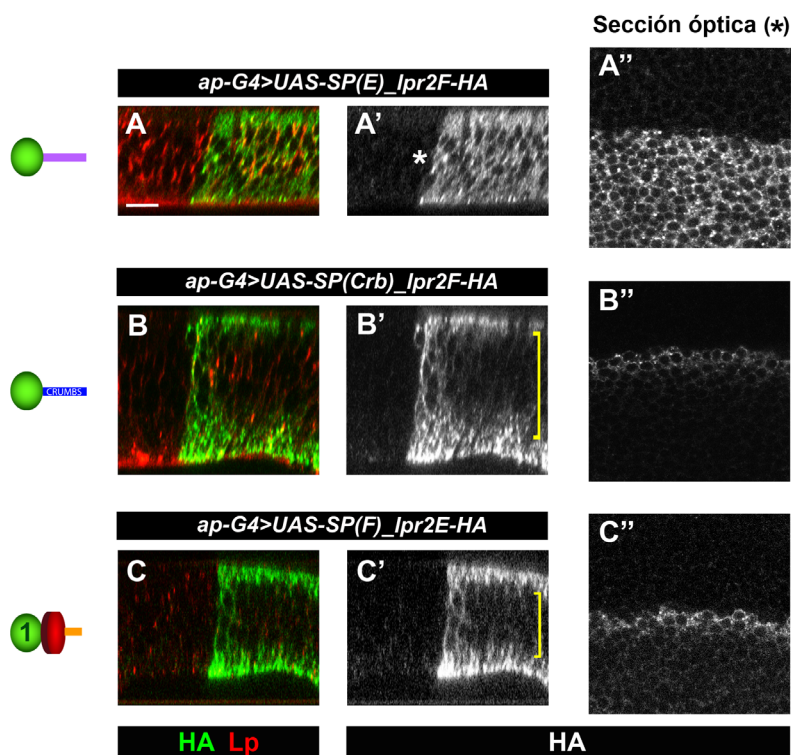


Figura 31. La distribución de las isoformas de los receptores de lipoforinas viene determinada por el tipo de péptido señal que presente. (A-C) Sección transversal de discos imaginales de ala en los que se han sobre-expresado diferentes quimeras en el compartimento posterior. Los dominios proteicos relevantes de las quimeras expresadas ectópicamente están representados a la izquierda de la figura. El asterisco muestra la zona donde se tomó la sección óptica, que se presenta en un canal desglosado en gris. La detección del receptor se realizó con α -HA en verde

y la distribución de lipoforinas con α -Lp en rojo, marcando los contornos celulares. Al intercambiar los péptidos señales en las quimeras SP(E)_Lpr2F-HA (A-A”) y SP(F)_Lpr2E-HA (C-C”) la distribución del receptor varía en función del péptido señal y no del resto de la proteína. En el caso de la quimera SP(Crb)_Lpr2F-HA (B-B”) la distribución es más parecida a la que se observa con el péptido señal típico. Barra de escala: 10 μ m. Todos los paneles se muestran al mismo aumento.

Todos estos resultados sugieren que la distinta distribución de los receptores de lipoforinas en el disco imaginal de ala, viene determinado por el tipo de péptido señal que presente: típico o atípicamente largo. Además, en el caso del péptido señal largo procedente de las isoformas transcritas desde el promotor distal (Lpr2E), su función no se debe a la longitud sino a propiedades intrínsecas de éste. Más adelante analizaremos en más detalle la secuencia del péptido señal largo de la isoforma Lpr2E.

1.3. Fusión de un epítipo extracelular a distintas isoformas de los receptores de lipoforinas

Las diferencias de distribución mostradas por las distintas isoformas podrían deberse a una distinta acumulación en la membrana plasmática, donde ejercen su función a través de la interacción con sus ligandos. Una de las mejores técnicas para analizar la distribución en membrana de un receptor consiste en detectar el ectodominio mediante un anticuerpo en

tejidos en los que no se ha permeabilizado la membrana plasmática. Sin embargo, los transgenes que hemos utilizado hasta ahora no son útiles para ello, ya que tanto el epítipo HA con el que están marcados como el epítipo detectado por α -Lpr2, se localizan en la región intracelular de la proteína. Por ello, decidimos añadir una etiqueta en el ectodominio de las isoformas utilizadas hasta ahora, Lpr2E y Lpr2F. Para permitir detectar de forma simultánea el ectodominio y el dominio intracelular, realizamos pruebas fusionando las etiquetas Flag o Myc en el ectodominio y HA en el dominio intracelular.

Epítipo Flag

En una primera aproximación, añadimos una copia del epítipo Flag (Hopp *et al.*, 1988) inmediatamente después del péptido señal (Figura 32A), tras Leu110 y Leu30 para las isoformas Lpr2E y Lpr2F respectivamente. Elegimos este epítipo debido a su pequeño tamaño, que no debería interferir con la síntesis y plegamiento de las proteínas. Sorprendentemente, al sobre-expresar estas construcciones *in vivo* tanto en discos imaginales de ala (Figura 32B-B'''), como en células S2 (Figura 32C-C' y D-D') se observó una expresión muy débil o nula (no mostrado) al utilizar el anticuerpo anti-Flag para su detección. No obstante, la tinción con anti-HA, epítipo también presente en las nuevas construcciones, fue la esperada (Figura 32B).

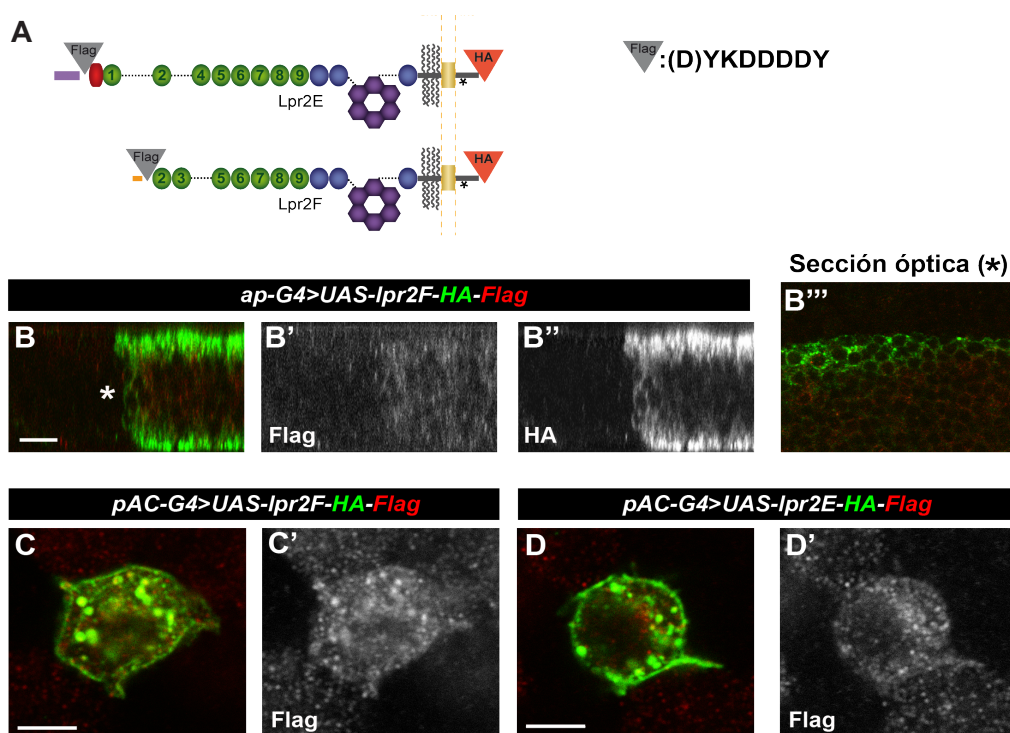


Figura 32. El epítipo Flag no es un buen marcador extracelular para los receptores de lipoforinas. (A) Representación modular de las isoformas Lpr2E y Lpr2F conteniendo el epítipo HA en el dominio intracelular (triángulo rojo) y el epítipo Flag inmediatamente después del péptido señal (triángulo gris) cuya secuencia se muestra a la derecha. La línea de puntos muestra la región transmembrana (B-B''') Planos transversales de discos imaginales de alas sobre-expresando en el compartimento posterior la isoforma Lpr2F conteniendo ambos epítipos. El asterisco muestra la zona donde se tomó la sección óptica que se muestra a la derecha (B'''). (C-D) Expresión de las isoformas Lpr2E y Lpr2F en células S2 de *Drosophila*. La distribución de los receptores fue detectada con α -HA en verde y α -Flag en rojo. Barra de escala: 10 μ m.

Examinamos la posibilidad de que la introducción del epítipo Flag en la proteína en una posición cercana al sitio de corte del péptido señal, hubiera modificado el sitio de procesamiento eliminando total o parcialmente el epítipo Flag. Analizamos el sitio de corte teórico de los péptidos señal con el software SignalP 4.1 (Bendtsen *et al.*, 2004) y PrediSi (Hiller *et al.*, 2004), que dieron resultados idénticos. En el caso de la isoforma Lpr2E, el sitio de corte se modificaba de Ala88 a Ser57 mientras que en la isoforma Lpr2F no se alteraba Ala24. En ambos casos, los sitios de corte teóricos no afectaban a la secuencia Flag.

Epítipo Myc

Como las fusiones con el epítipo Flag resultaron difíciles de detectar por inmunohistoquímica, decidimos realizar nuevas construcciones insertando una etiqueta diferente en la región extracelular: seis copias del epítipo Myc (6xMyc). Para evitar posibles interferencias con el procesamiento del péptido señal, se insertó entre el dominio EGF-C y la región de O-glicosilación de los receptores, una zona compartida entre las dos isoformas (Lpr2E y Lpr2F). Al tratarse de una posición entre dominios proteicos, es menos probable que afecte al plegamiento de la proteína (Figura 33A).

El anticuerpo anti-Myc detectaba adecuadamente las proteínas Lpr2E-HA-Myc y Lpr2F-HA-Myc, con una eficiencia semejante a anti-HA, como puede observarse en la Figura 33 B-B'' y C-C'', en la que sobre-expresamos *UAS-lpr2E-HA-Myc* y *UAS-lpr2F-HA-Myc* en el compartimento dorsal de discos imaginales de ala usando la línea activadora *ap-Gal4*. En estas inmunotinciones nos dimos cuenta de un hecho inesperado. De un lado, al expresar *UAS-lpr2E-HA-Myc* en el disco imaginal y detectar la proteína simultáneamente con el epítipo HA y Myc, ambos epítipos co-localizan perfectamente, siendo la distribución de la proteína en el citoplasma celular homogénea a lo largo del eje apico-basal (Figura 33B-B''). Sin embargo, en el caso de la isoforma Lpr2F los dos epítipos no co-localizaban completamente. Mientras que con el epítipo HA, Lpr2F se detectaba como ya hemos descrito y aparecía el Efecto borde, con el epítipo Myc la misma proteína se detectaba en el citoplasma celular a altos niveles en los dominios apical y basal pero también, a menor nivel, en un plano intermedio en el eje apico-basal del disco imaginal. Es decir, con el epítipo Myc no se observa el Efecto borde (Figura 33C-C''). Estas diferencias pueden apreciarse claramente en una sección óptica realizada en un plano intermedio en el eje apico-basal (Figura 33C'', asterisco). Por tanto, con anti-HA sólo detectamos parte de la proteína sobre-expresada. A pesar de ello, con ambos epítipos se observa una fuerte acumulación de Lpr2F tanto en apical como en basal que no ocurre con Lpr2E (Figura 33C-C'', flecha). Nuestros datos anteriores indicaban que el péptido señal juega un papel fundamental en cuanto a la distribución de las distintas isoformas. Para comprobarlo, añadimos el epítipo 6xMyc a las quimeras con los péptido señal intercambiados generando SP(E)_Lpr2F-HA-Myc y SP(F)_Lpr2E-HA-Myc. Al sobre-expresar estas proteínas en discos imaginales de ala y detectarlas con anti-Myc, la quimera SP(E)_Lpr2F-HA-Myc muestra una distribución similar a Lpr2E (Figura 33D-D''), mientras que la quimera SP(F)_Lpr2E-HA-Myc se distribuye de manera semejante a la isoforma Lpr2F, observándose una mayor cantidad de receptor en apical (Figura 33E-E'') y evidenciándose el Efecto borde al comparar la tinción con anti-HA y con anti-Myc (Figura 33E''). Por tanto, se corrobora nuestra conclusión inicial que daba al péptido señal un papel relevante en definir la distribución de las isoformas Lpr2E y Lpr2F.

Para examinar la fracción de receptor localizado en la membrana, realizamos una tinción extracelular siguiendo un protocolo modificado de Strigini and Cohen, 2000, en el que la incubación con el anticuerpo anti-Myc se realiza sin permeabilizar las células y a 4°C para

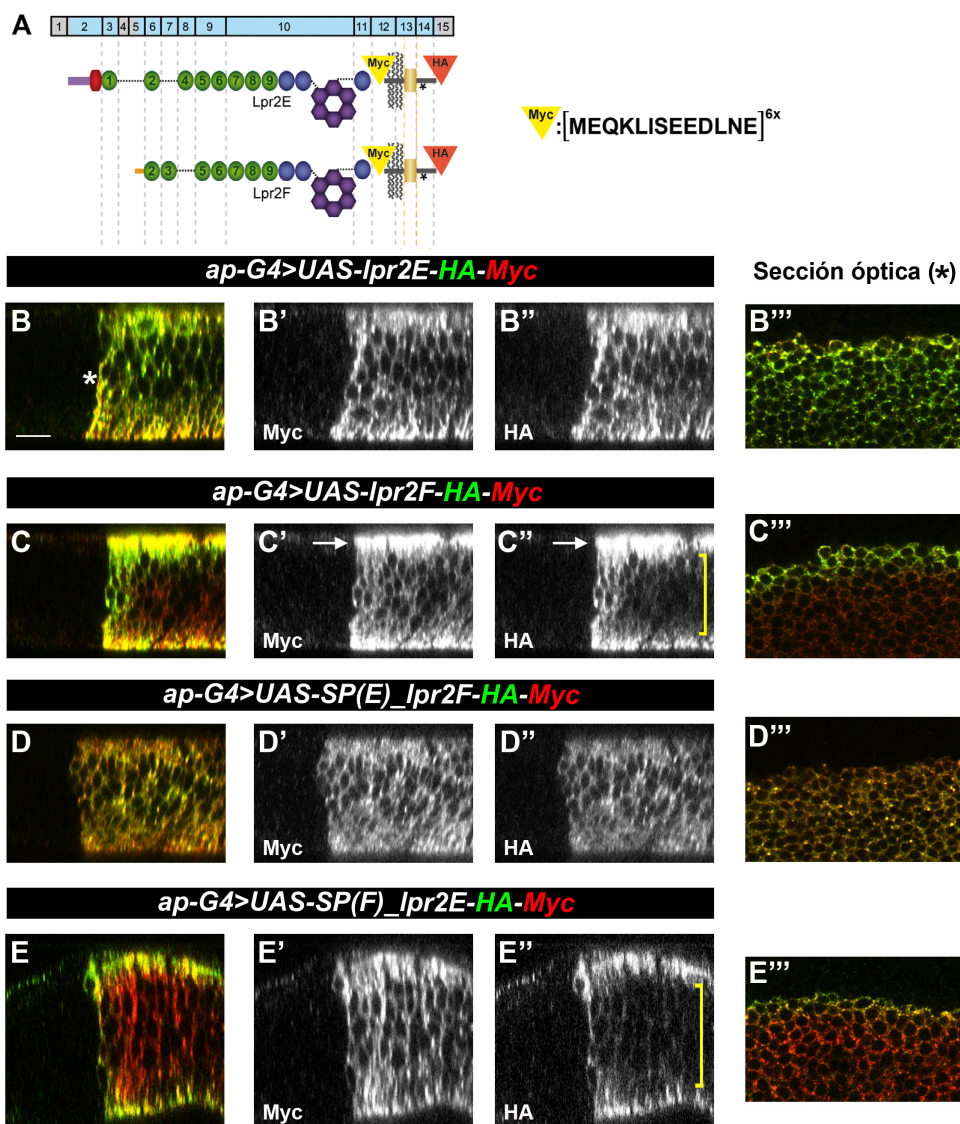


Figura 33. El epítipo Myc es capaz de detectar la proteína de manera eficiente. (A) Representación modular de las isoformas Lpr2E y Lpr2F conteniendo el epítipo HA en el dominio intracelular (triángulo rojo) y el epítipo Myc entre el dominio de O-glicosilación y el dominio EGF-C (triángulo amarillo), cuya secuencia se indica a la derecha. La correspondencia entre dominios proteicos del receptor y los exones se muestra en el rectángulo azul de arriba. Planos sagitales de discos imaginales de ala sobre-expresando Lpr2E (B), Lpr2F (C), SP(E)_Lpr2F (D) y SP(F)_Lpr2E (E) en el compartimento dorsal. La distribución de las proteínas fue detectada con α -Myc en rojo y α -HA en verde, ambos se muestran también en un canal desglosado (B'-E' y B''-E'' respectivamente) en gris. El asterisco muestra la zona donde se tomó la sección óptica. La inmunotinción con la isoforma Lpr2E es muy similar con ambos epítipos (B), sin embargo, con la isoforma Lpr2F se observa como la inmunotinción con myc difiere a la de HA (C), no obstante con ambos epítipos observamos una importante acumulación de proteína en apical (flechas blancas). Barra de escala: 10 μ m. Todos los paneles se muestran al mismo aumento.

Al combinar la tinción extracelular del epítipo Myc con la tinción estándar del epítipo HA intracelular, vimos que la mayor parte de la proteína que observamos en basal se localiza en la membrana. Por el contrario, en apical la localización de los receptores es mayoritariamente intracelular (Figura 34 Comparar B' y C' con B'' y C'').

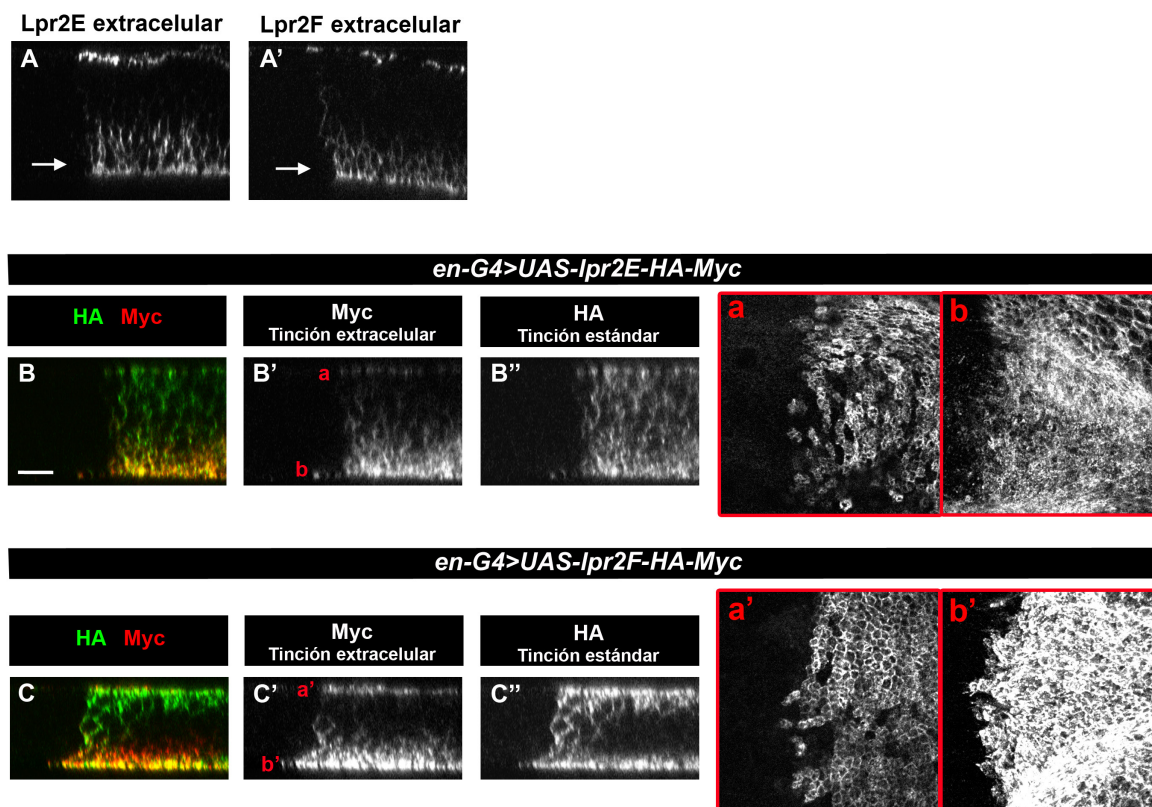


Figura 34. Las isoformas Lpr2E y Lpr2F se distribuyen de manera similar en la membrana. (A-C) Cortes transversales de discos imaginales de ala sobre-expresando *UAS-lpr2E-HA-Myc* ó *UAS-lpr2F-HA-Myc* en el compartimento posterior (*en-Gal4*). Las proteínas extracelulares fueron detectadas por un protocolo modificado sin permeabilización de las células con el anticuerpo α -Myc mostrado en rojo (B-C) y en un canal desglosado en gris (B'-C'). Además, se detectó la proteína total con la tinción estándar usando el anticuerpo α -HA en verde y en un canal desglosado en gris (B'', C''). A la derecha se muestran planos apicales (a, a') y basales (b, b') del disco de ala. Lpr2E y Lpr2F se acumulan con niveles similares en dos dominios, en las membranas celulares apicales y basolaterales. Barra de escala: 10 μ m. Todos los paneles se muestran al mismo aumento.

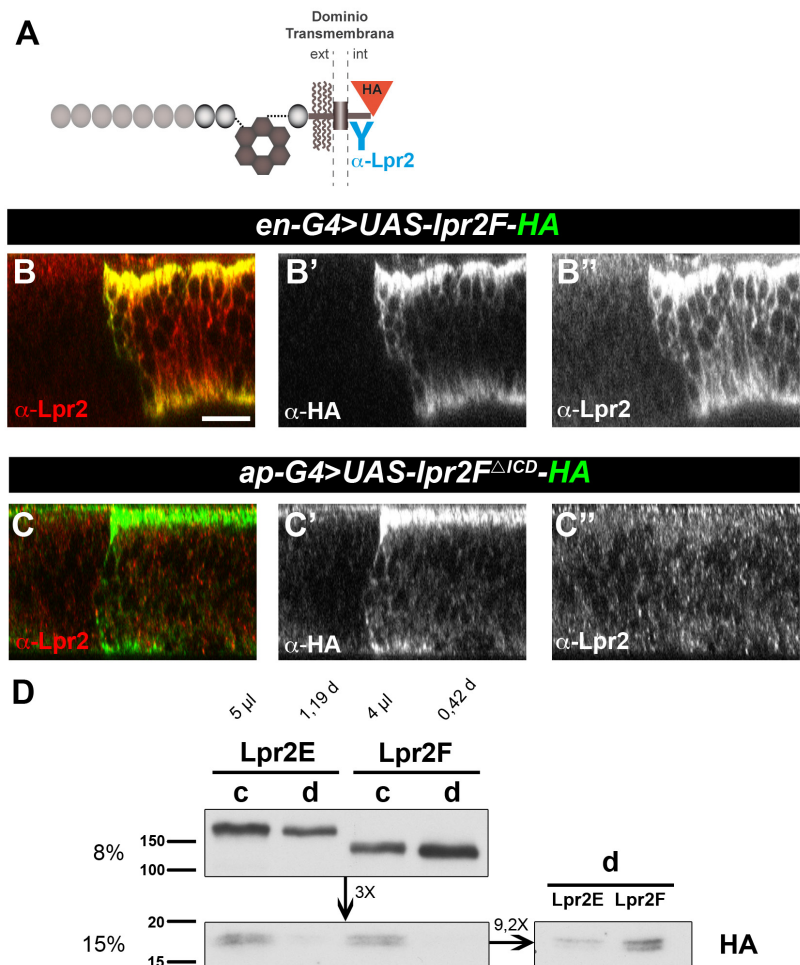
1.4. Los altos niveles de expresión de Lpr2F inducen apoptosis

Como hemos comentado anteriormente, la distribución de la isoforma Lpr2F después de su sobre-expresión en discos imaginales de ala es distinta según se detecte con anti-HA o con anti-Myc (Ver Figura 34). Teniendo en cuenta que el epítipo HA se localiza en la cola intracelular de Lpr2F mientras que el epítipo Myc se encuentra en el ectodominio, este resultado podría sugerir que la isoforma Lpr2F puede procesarse y perder su dominio intracelular cómo se ha descrito para otras proteínas de la familia LDLR, en particular LRP1 y Megalin (May *et al.*,

2002 y Hjälml *et al.*, 1996). Para examinar esta posibilidad, en primer lugar decidimos detectar la proteína Lpr2F-HA con un anticuerpo policlonal generado específicamente contra el dominio intracelular de Lpr2 (Parra-Peralbo and Culi, 2011) para comprobar si se reproducía la distribución detectada con anti-HA (Figura 35A). No fue el caso. Al sobre-expresar UAS-*lpr2F-HA* con *ap-Gal4* en el disco imaginal y realizar una inmunotinción con anti-HA y anti-Lpr2, observamos que con este último se detecta claramente tinción en la zona del citoplasma intermedia mientras que con anti-HA no es así (Figura 35B-B"). Estos datos sugieren que la diferencia en la distribución de Lpr2F-HA-Myc detectada con anti-HA y anti-Myc no se debe al procesamiento del dominio intracelular. Esta conclusión se confirmó al ver que la proteína Lpr2F^{ΔICD}-HA, que consiste en la isoforma Lpr2F a la que se deletionó el dominio intracelular, no se detecta en el citoplasma celular en posiciones intermedias del eje apico-basal mediante el anticuerpo HA (Figura 35C-C"). Por tanto, estos datos sugieren que las diferencias de distribución detectadas con anti-HA no se deben al procesamiento del dominio intracelular.

Figura 35. El Efecto borde no se debe al procesamiento del dominio intracelular.

(A) Representación modular del receptor de lipoforinas mostrando la localización del epítipo HA en la región C-terminal (triángulo rojo) y del anticuerpo α-Lpr2 (azul) frente a la región intracelular. Expresión ectópica en el compartimento posterior del disco imaginal de ala de la isoforma Lpr2F (B) ó la isoforma Lpr2F careciendo del dominio citosólico: Lpr2F^{ΔICD} (C). La distribución del receptor fue detectada con α-HA en verde y α-Lpr2 en rojo, ambos se muestran en un canal desglosado en gris. Anti-Lpr2 detecta expresión en la zona intermedia del



del disco, mientras que anti-HA no. El anticuerpo frente al dominio intracelular no reconoce la quimera Lpr2F^{ΔICD} (C"). Barra de escala: 10 μm. Todos los paneles se muestran al mismo aumento. (D) Western blot de células S2 (c) y discos de ala (d) expresando Lpr2E o Lpr2F. El panel superior se corresponde con la proteína completa y los paneles inferiores con los posibles productos resultantes del procesamiento de los receptores. La proteína se detectó con α-HA. Arriba se muestran las cantidades cargadas en el gel.

Por otro lado, examinamos el posible procesamiento proteolítico del dominio intracelular mediante experimentos de *western blot* con extractos de células S2 y de discos imaginales de ala en los que se expresaron Lpr2E o Lpr2F (Figura 35D).

Observamos en todos los casos una banda mayoritaria de alto peso molecular correspondiente a la proteína completa y un doblete minoritario de bajo peso molecular (alrededor de 18 kDa) que podría corresponder al dominio intracelular procesado (Figura 35D). Sin embargo, nuestros datos no permiten concluir que exista un procesamiento diferencial entre Lpr2E y Lpr2F.

En la bibliografía se describe que el epítipo HA, presente en la región C-terminal de nuestros transgenes, puede procesarse y perder inmunorreactividad durante el proceso de muerte celular por apoptosis, ya que es reconocido por las caspasas (Schembri *et al.*, 2007). Por esta razón, investigamos si la sobre-expresión de los receptores de lipoforinas podría estar induciendo apoptosis y ello interferir con la detección de las proteínas mediante anti-HA.

Las células del disco imaginal de ala son extruidas basalmente del epitelio cuando sufren muerte celular por apoptosis, acumulándose en esa región (Figura 36B) (Li and Baker, 2007). Teniendo esto en cuenta, sobre-expresamos las isoformas Lpr2E y Lpr2F utilizando la línea activadora *patched-Gal4* (*ptc-Gal4*) (Figura 36A-A", C-C" y D). Esta línea nos permite dirigir la expresión en una región muy limitada del disco (el borde antero-posterior). Vimos que la sobre-expresión de la isoforma Lpr2F induce la formación de agregados celulares en basal, detectados mediante microscopía Nomarski (Figura 36D), sugiriendo que hay un proceso apoptótico. Efectivamente, al teñir los núcleos celulares mediante la tinción DAPI observamos que estas células extruidas tenían núcleos picnóticos y además, co-localizan con la caspasa3 activada, un marcador de muerte celular (Figura 36C' y C", respectivamente).

Hemos visto anteriormente que la diferencia de la distribución entre ambos receptores se debe al tipo de péptido señal que presente. Por esta razón, decidimos analizar la correlación entre el tipo de péptido señal y la inducción de apoptosis tras su sobre-expresión. De este modo, al añadir el dominio LA1 a la isoforma Lpr2F se aprecian agregados celulares, indicando que hay muerte celular por apoptosis (Figura 36E-E', recuadro amarillo), no obstante, las quimeras que contienen el dominio NCN (Figura 36F-F'), todo el dominio N-terminal (LA1+NCN) (Figura 36G-G') o el péptido señal atípicamente largo de la isoforma Lpr2E (Figura 36H-H'), no se observó apoptosis. Por lo tanto, sólo se aprecian los agregados celulares característicos de la apoptosis (recuadro amarillo) con la quimera conteniendo el péptido señal típico (Figura 36E-E'). En cambio, el resto de quimeras que contienen el péptido señal largo no desencadenan el proceso apoptótico (Figura 36F-F', G-G' y H-H'). De este modo, los datos indican que el péptido señal además de determinar la distribución, también influye en la inducción de muerte celular por apoptosis.

Todo ello sugiere que la ausencia de proteína en la región central del disco de ala, lo que hasta ahora hemos denominado "Efecto borde", se debe al procesamiento del epítipo HA promovida por la muerte celular debido a la sobre-expresión de las isoformas y quimeras con péptido señal típico. Si es así, al bloquear la apoptosis se debería recuperar esta tinción. Co-expresamos el transgen *UAS-lpr2F-HA* junto con *UAS-diap1*, siendo DIAP1 una enzima E3-ubiquitín ligasa cuya función principal es la inhibición de la apoptosis mediante la degradación de las caspasas iniciadoras (Wang *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 2000). Como puede observarse en la Figura 37A-A", la inmunotinción de la región central se recupera totalmente con el anticuerpo anti-HA al bloquear la apoptosis (desaparece el Efecto borde) mientras que ello no ocurre en el control en el que co-expresamos *UAS-GFP* (Figura 37B-B").

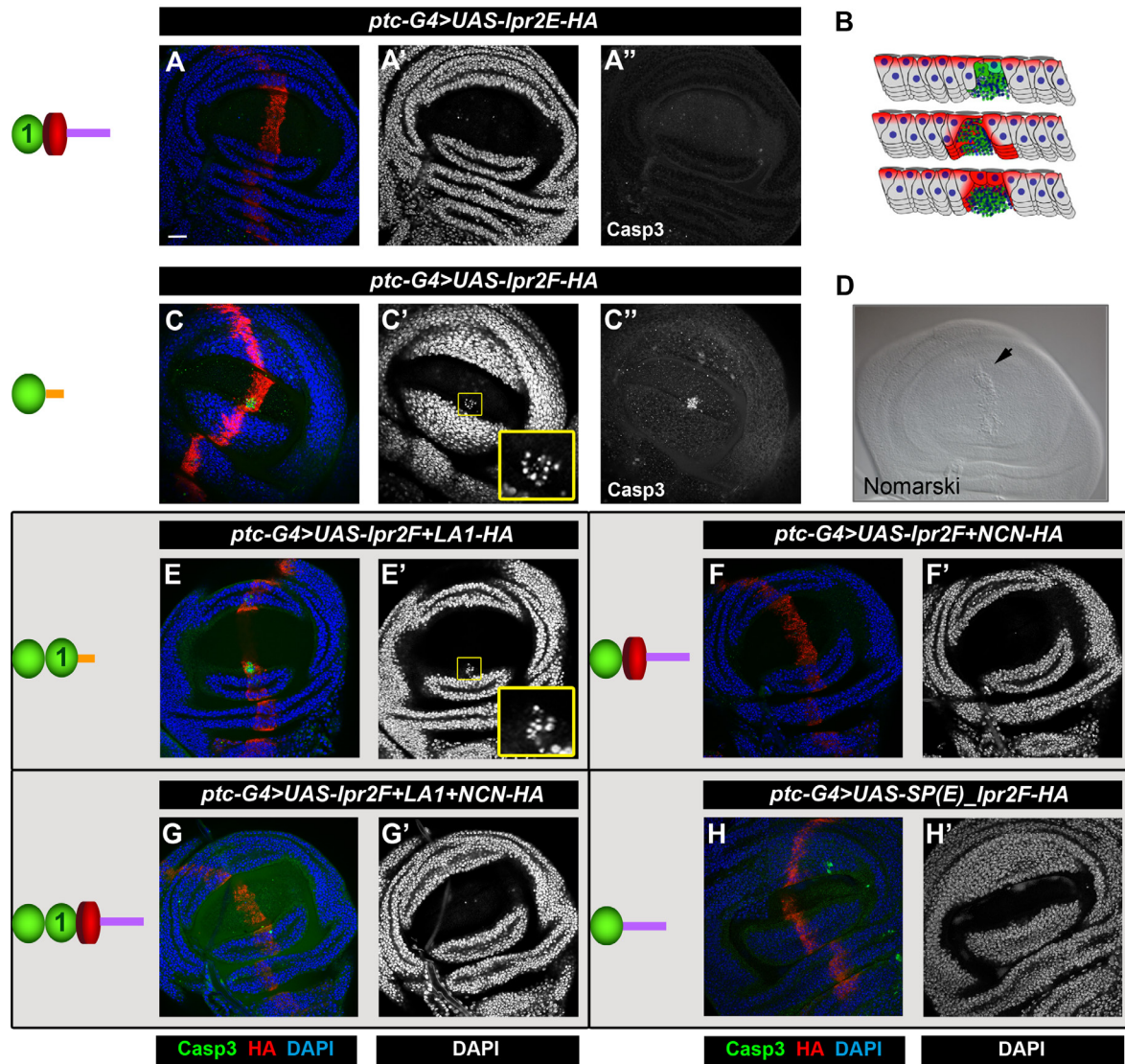


Figura 36. La sobre-expresión de Lpr2F, pero no de lpr2E, induce apoptosis celular. (A,C,E-H) Expresión ectópica de las isoformas y quimeras indicadas de los receptores de lipoforinas en el borde antero-posterior del disco imaginal de ala. El receptor se detectó con α -HA en rojo, los núcleos en azul con DAPI y las células apoptóticas con α -casp3 activada en verde. (B) Esquema representando el epitelio del disco imaginal de ala, siendo apical arriba y basal abajo, donde se observa como las células apoptóticas caen hacia la región basal. Tomada de Bergantiños *et al.*, 2010. (D) Imagen del disco imaginal de ala sobre-expresando la isoforma Lpr2F tomada mediante microscopia Nomarski. La sobre-expresión de Lpr2F (C, D) y de Lpr2F+LA1 (E) induce la acumulación de células apoptóticas en un dominio basal, mientras que no es así para Lpr2E (A) o para Lpr2F+NCN (F), Lpr2F+LA1+NCN (G) y SP(E)_Lpr2F (H). Barra de escala: 100 μ m. Todos los paneles se muestran al mismo aumento.

Por tanto, una de las principales diferencias en la distribución subcelular entre las isoformas Lpr2E y Lpr2F, la presencia del Efecto borde, se debe a un artefacto causado por el procesamiento del epítipo HA por caspasas. Sin embargo, otras diferencias en su distribución las observamos tanto en inmunotinciones con Myc como con anti-Lpr2. En particular observamos una preferente acumulación de la isoforma Lpr2F en la región apical en comparación con la isoforma Lpr2E que se distribuye homogéneamente y en vesículas.

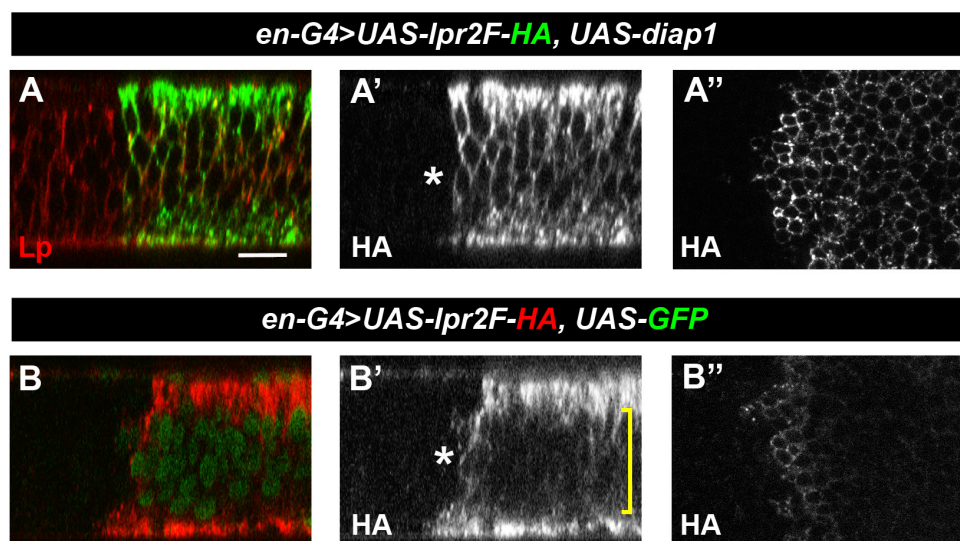


Figura 37. La apoptosis fomenta el procesamiento del epítipo HA. Co-sobre-expresión de la isoforma Lpr2F en el compartimento posterior del disco imaginal de ala junto con el inhibidor apoptótico DIAP1 (A) ó la proteína GFP (B). El asterisco muestra la zona donde se tomó la sección óptica, que se presenta en un canal desglosado en gris (A' y B'') y la llave muestra la zona donde la proteína no se detecta. Al inhibir la apoptosis, se recupera la tinción para Lpr2F en las membranas laterales (A'). Barra de escala: 10 μ m. Todos los paneles se muestran al mismo aumento.

1.5. Función de los péptidos señal de las isoformas de los receptores de lipoforinas

Dado que las diferencias mostradas entre las distintas isoformas: a) inducción de la apoptosis y b) acumulación de la proteína en el citoplasma apical, viene determinado por el péptido señal que presente, nos preguntamos cuál era el mecanismo por el que el péptido señal afecta a estos procesos. Como hemos mencionado en la introducción, el péptido señal actúa en el transporte de la proteína que está iniciando su traducción hacia la membrana del retículo, a este proceso se le denomina en inglés *targeting*. Además, se ha descrito que los péptidos señal contienen información que determina la eficiencia de translocación, su procesamiento e incluso funciones posteriores a éste (Hegde and Bernstein, 2006).

En primer lugar, examinamos si el péptido señal podría determinar los **niveles de expresión** de las distintas isoformas. Para estudiar esta hipótesis, sobre-expresamos las isoformas *UAS-lpr2E-HA-Myc* y *UAS-lpr2F-HA-Myc*, en el compartimento posterior del disco imaginal de ala con la línea activadora *en-Gal4* y analizamos los niveles de proteína mediante *western blot* y detección con anti-Myc. Preparamos extractos de discos de ala procedentes de larvas en estadio LIII y distintas diluciones se analizaron en geles de poliacrilamida (Figura 38A). Vimos que la isoforma conteniendo el péptido señal típico (Lpr2F) estaba unas 10 veces más concentrada respecto a la isoformas con un péptido señal atípicamente largo (Lpr2E). Descartamos que estas diferencias en los niveles de proteína se debieran a distintos niveles de transcripción ya que ambos transgenes están insertados en la misma posición cromosómica (22A). Ello sugiere

que el péptido señal largo es menos eficiente. Esta diferencia podría ser específica de tejido. Para averiguarlo sobre-expresamos estos receptores utilizando diferentes líneas activadoras específicas de diversos órganos, entre ellos el cerebro (Figura 38B). En el cerebro utilizamos la línea activadora *elav-Gal4*, que se expresa en neuronas y *repo-Gal4* específica de la glía. El resultado obtenido fue similar al anterior, ya que pudimos observar tanto en neuronas como en glía una mayor cantidad de proteína con la isoforma Lpr2F. Las diferencias son de al menos 10 veces, pero podrían ser mayores ya que en este experimento no pudimos detectar Lpr2E en cerebro. Estos resultados sugieren que hay una diferencia substancial en los niveles de proteína de las distintas isoformas debidas al péptido señal, y que ello no es específico de tejido (al menos en los tejidos analizados en esta tesis). Examinamos la validez de esta conclusión comparando la acumulación de Lpr2E y Lpr2F en células S2 en cultivo. En varios experimentos vimos como se acumula aproximadamente el doble de proteína Lpr2F que Lpr2E (no mostrado).

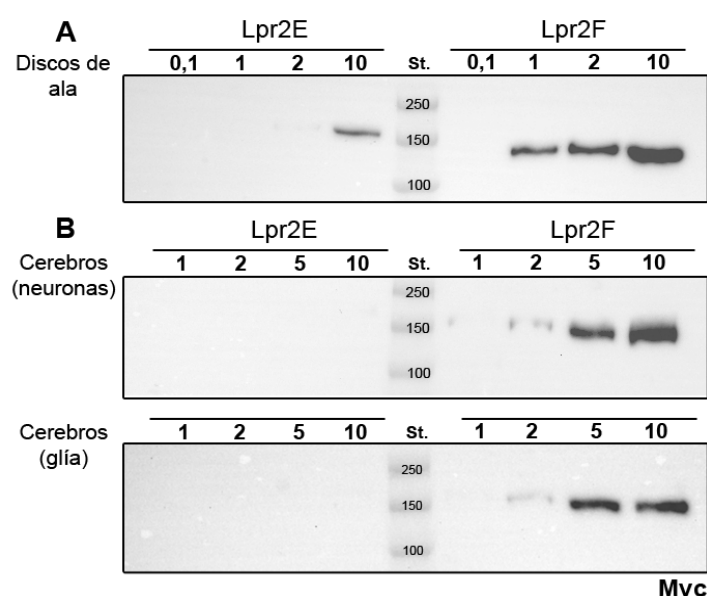


Figura 38. El transgen *UAS-Lpr2F* induce mayor expresión que *UAS-Lpr2E* independientemente del tejido donde se expresen. *Western blots* de cantidades crecientes de tejidos: discos imaginales de ala (A) y cerebro (B) en los que se han sobre-expresado *UAS-lpr2E-HA-Myc* ó *UAS-lpr2F-HA-Myc*. Las proteínas fueron detectadas con α -Myc. St. Marcador de peso molecular.

Esta diferencia podría tener dos posibles causas: mayor expresión o menor vida media de la isoforma Lpr2F. Para distinguir entre estas posibilidades, y teniendo en cuenta que experimentos de marcaje metabólico y pulso y caza en animales vivos no son factibles, analizamos la acumulación de las proteínas por *western blot* a tiempos muy cortos después de activar su transcripción. Teniendo en cuenta que la vida media del LDLR humano en fibroblastos es de unas 25 horas (Brown and Goldstein, 1975), podemos asumir negligible el efecto de la degradación a tiempos cortos. Examinamos las concentraciones de las siguientes isoformas y quimeras:

UAS-lpr2E-HA-Myc
UAS-lpr2F-HA-Myc
UAS-SP(E)_lpr2F-HA-Myc
UAS-SP(Crb)_lpr2F-HA

Activamos su expresión en discos de ala por periodos crecientes de tiempo gracias al uso del sistema Gal4 combinado con el represor Gal80 termosensible (Gal80^{ts}). Sobre-expresamos las distintas quimeras en un patrón restringido del disco imaginal de ala usando la línea activadora *nubbin-Gal4* (*nub-Gal4*). Tal como se muestra en la Figura 39A no obtenemos señal de ninguna isoforma en las primeras 4 horas, indicando que hay un retraso esperable necesario para la transcripción de los transgenes y el inicio de la traducción. Sin embargo, cuatro horas más tarde,

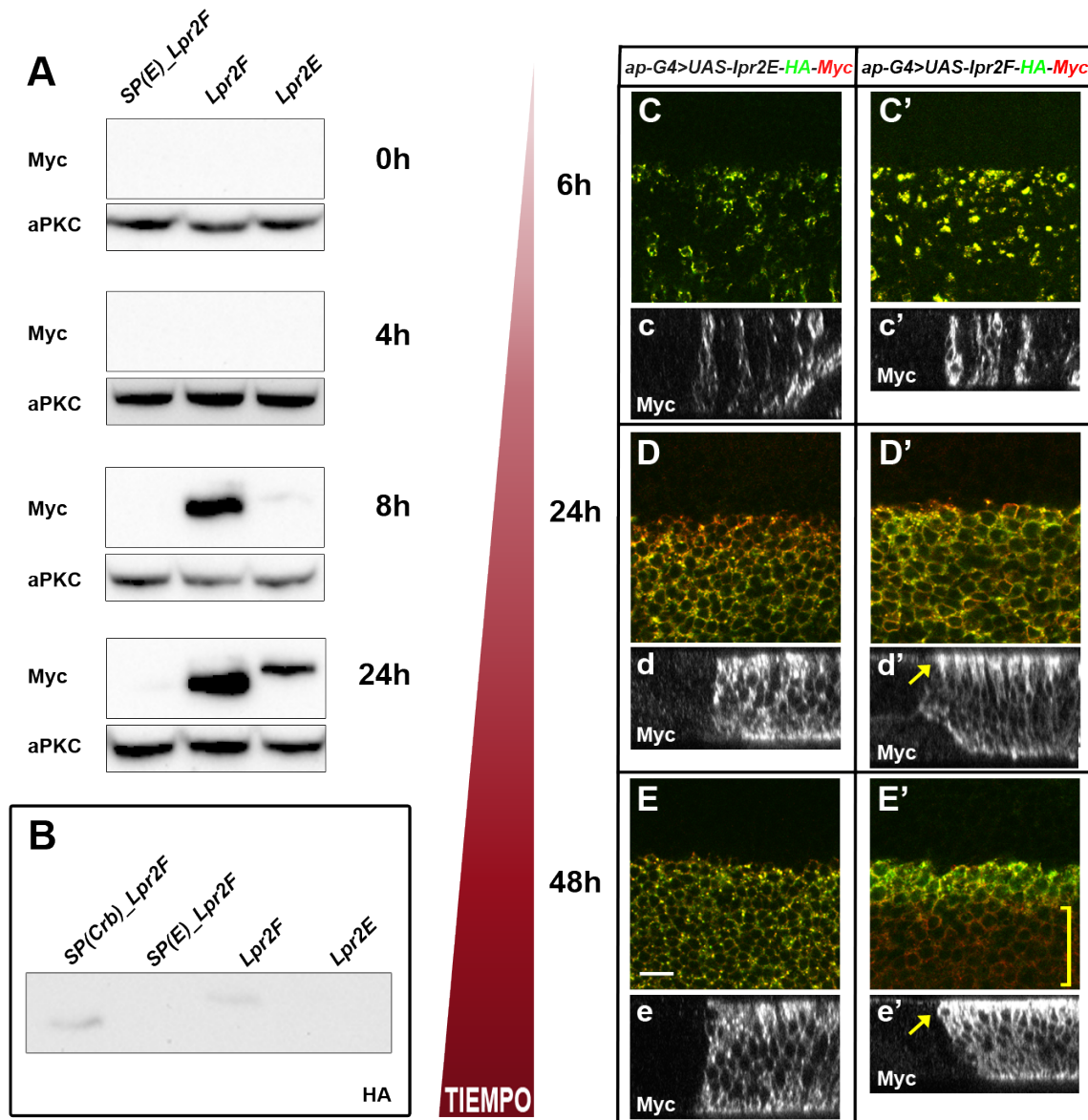


Figura 39. El péptido señal largo de las isoformas transcritas desde el promotor distal (Lpr2E) es menos eficiente que el péptido señal típico. (A-B) Western blots de discos imaginales de ala en los que se sobre-expresaron Lpr2E, Lpr2F y las quimeras SP(E)_Lpr2F y SP(Crb)_Lpr2F en el primordio del ala mediante la línea activadora *nub-Gal4*, usando el sistema *Gal80^{ts}*. (A) Los tiempos de expresión fueron de 0, 4, 8 y 24 horas. Los receptores se detectaron con α -Myc y como control de carga usamos la proteína aPKC (paneles inferiores). (B) Las proteínas se detectaron con α -HA y el tiempo de expresión de los receptores fue de 4 horas. (C,C'-E,E') Secciones ópticas de la zona intermedia de discos imaginales de ala en los que se expresaron ectópicamente Lpr2E y Lp2F durante periodos crecientes de tiempo (6, 24 y 48 horas) usando el sistema *Gal80^{ts}*. Los receptores se detectaron con α -HA en verde y α -Myc en rojo. En la parte inferior de cada sección óptica se muestran secciones transversales (c,c'-e,e') mostrando α -Myc en gris. Las flechas amarillas señalan la acumulación de la proteína en la región apical del disco de ala, y la llave la zona de baja tinción. Barra de escala: 10 μ m. Todos los paneles se muestran al mismo aumento.

a las 8 h, ya observamos una clara banda correspondiente a la isoforma Lpr2E, mientras que Lpr2E y la quimera SP(E)_Lpr2F son casi indetectables. Esta diferencia se mantiene a las 24 horas. También vimos que la proteína SP(E)_Lpr2F se acumula en menor medida que Lpr2E a pesar de contener el mismo péptido señal. Obtuvimos resultados parecidos en un segundo experimento en el que analizamos la acumulación de proteínas sólo 4 horas después de activar la transcripción, pero utilizando el anticuerpo anti-HA en lugar de anti-Myc, por ser anti-HA más sensible (Figura 39B). Detectamos una señal con la isoforma Lpr2F y la quimera conteniendo el péptido señal largo del Crumbs (SP(Crb)_Lpr2F), pero no obtuvimos señal con las isoformas conteniendo el péptido señal largo de Lpr2E (Lpr2E y SP(E)_Lpr2F).

Estos resultados bioquímicos indican que el péptido señal largo de la isoforma Lpr2E es menos eficiente en el proceso de *targeting efficiency* respecto al péptido señal típico de Lpr2F y estimamos esta diferencia en unas 10 veces. Además, esta disminución de la eficiencia no es compartida por otros péptidos señal largos, como el de la proteína Crumbs.

Nuestros datos sugieren que gran parte de las diferencias observadas entre la distribución subcelular de las distintas isoformas de los receptores de lipoforinas se deben simplemente a que el péptido señal corto permite altos niveles de expresión y de acumulación de la proteína, lo que desemboca en una distribución distinta a la de las isoformas que se traducen a bajos niveles y a la inducción de apoptosis. Si ello es así, debería ser posible reproducir estos efectos simplemente induciendo altos o bajos niveles de síntesis, ya fuera de Lpr2E o Lpr2F. Para comprobar esta posibilidad examinamos primero cómo progresa la distribución subcelular de Lpr2E y Lpr2F desde que se induce su expresión hasta que llegan a una situación de equilibrio. Para ello, las sobre-expresamos en el compartimento dorsal de discos imaginales de ala usando la línea activadora *ap-Gal4* durante 6, 24 y 48 horas usando nuevamente el represor Gal80^{ts}. A las 6 horas se observa como la distribución de ambos receptores es muy similar, acumulándose en parches en el dominio de sobre-expresión y presentando una serie de huecos tanto en la sección transversal (Figura 39C-C'), como en el eje Z (Figura 39c-c'), acumulándose homogéneamente en todo el citoplasma de las células. No se observan cambios significativos 24 horas más tarde (Figura 39D-D'), sin embargo, se comienza a contemplar cierta acumulación de Lpr2F en apical (Figura 39d-d', flecha). Tras 48 horas Lpr2F se acumula principalmente en apical (Figura 39e', flecha) y aparece el denominado Efecto borde por procesamiento del epítipo HA por caspasa. (Figura 39 Comparar E' con E, llave).

Con el fin de modificar los niveles de expresión o de proteína de las distintas isoformas, realizamos las siguientes manipulaciones genéticas:

- Por un lado, **incrementamos** los niveles de la isoforma Lpr2E (péptido señal largo), sobre-expresando 2 copias del transgen: *UAS-lpr2E-HA-Myc*, en el compartimento posterior del disco imaginal de ala. Incubamos durante 2 días las larvas resultantes del cruce a 29°C, temperatura a la cual el sistema UAS-Gal4 tiene su actividad máxima (Duffy, 2002). Tras ese periodo de tiempo, diseccionamos.
- Por otro lado, **disminuimos** los niveles de proteína de la isoforma Lpr2F (péptido señal típico) sobre-expresando en disco imaginal de ala una sola copia del transgen: *UAS-lpr2F-HA-Myc*^{+/+} a 18°C (temperatura a la cual el sistema UAS-Gal4 funciona a bajos niveles) (Duffy, 2002) hasta el momento de la disección.

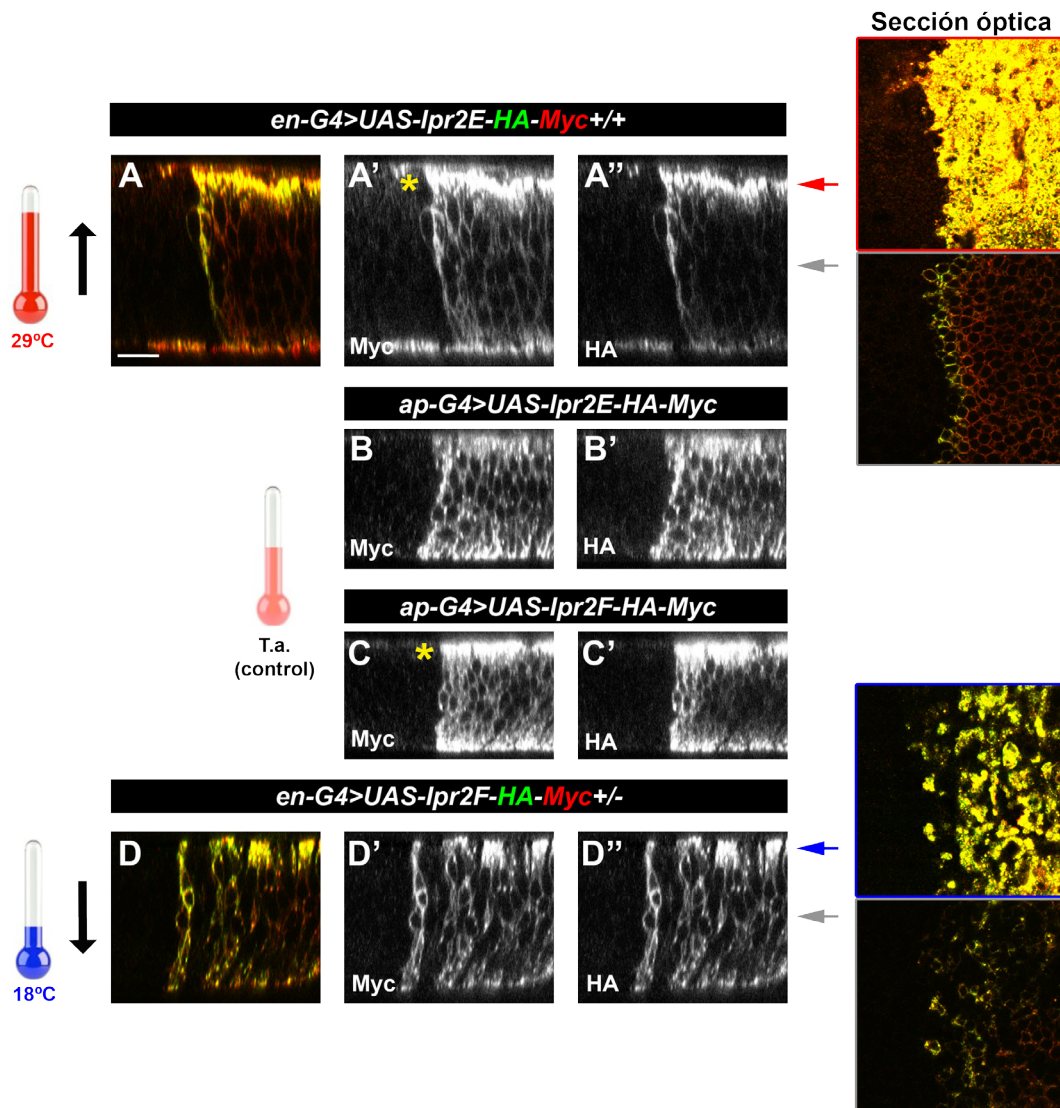


Figura 40. Los niveles de expresión de los receptores de lipoforinas pueden afectar a su distribución subcelular. (A-D) Cortes transversales de discos imaginales de ala expresando de manera ectópica en el compartimento posterior o dorsal los receptores de lipoforinas. (A) Incremento de los niveles de proteínas sobre-expresando dos copias de la isoforma Lpr2E a 29°C. (B-C) Controles en los que se expresan ectópicamente las isoformas Lpr2E y Lpr2F a temperatura ambiente. (D) Disminución de los niveles de proteínas sobre-expresando una copia de la isoforma Lpr2F a 18°C. Los receptores se detectaron con α -Myc en rojo y α -HA en verde, ambos se mostraron en un canal desglosado (A',B,C,D' y A'',B',C',D'' respectivamente) en gris. El asterisco señala la zona apical del disco. Las flechas roja y azul indican la zona donde se ha realizado la sección (sub)apical y las flechas grises una sección intermedia. Barra de escala: 10 μ m. Todos los paneles se muestran al mismo aumento.

Vemos que a altos niveles de la isoforma Lpr2E, ésta se acumula fundamentalmente en la región apical donde normalmente se encuentra la isoforma Lpr2F (Figura 40A' comparado con C. Asterisco amarillo) y se pierde la inmunorreactividad con anti-HA, apareciendo el Efecto borde (Figura 40A'' comparado con C'). Por el contrario, a bajos niveles de la isoforma Lpr2F, ésta se distribuye mayormente de forma homogénea en el citoplasma de las células a lo largo del eje apico-basal, aunque en algunas células sigue habiendo una cierta mayor acumulación en

apical (Figura 40D-D'' comparado con B-B'). También observamos acumulación en vesículas. Curiosamente la expresión del receptor ocurre en parches en el dominio de sobre-expresión, probablemente consecuencia de la baja eficiencia del sistema UAS-Gal4 a 18°C (Figura 40D-D'', flecha y recuadro azul respectivamente).

En su conjunto, estos resultados nos permiten concluir que la acumulación preferencial de Lpr2F en apical y la aparición del Efecto borde se deben principalmente a la presencia de altos niveles de proteína.

Para determinar qué particularidad presenta el péptido señal largo de la isoforma Lpr2E que pueda explicar su baja eficiencia, habiendo ya descartado que se tratara solo de su longitud, quisimos comparar la secuencia de los péptidos señal de los receptores de lipoforinas en varias especies para examinar si tienen alguna característica conservada y por tanto, probablemente importante. De este modo, obtuvimos de la base de datos Uniprot las secuencias de los receptores de lipoforinas 1 y 2 en diferentes especies del género de *Drosophila* así como en otros dípteros más distanciados evolutivamente que pudieran contener un péptido señal similar. A continuación, analizamos el sitio de corte del péptido señal con los programas informáticos PresiSi y SignalP (Ver anexo I). Es importante resaltar que de todas las especies de dípteros analizadas, encontramos péptidos señal atípicos en dos de ellas, *Ceratitis capitata* (mosca del mediterráneo) y *Musca domestica*, pero no así en otros insectos modelo como el mosquito *Aedes aegypti* o *Manduca sexta*.

El alineamiento de los péptidos señal atípicos mediante el software clustalW (Figura 41), agrupó en primer lugar las secuencias según si pertenecían a Lpr1 o Lpr2. Asimismo, el péptido señal del único receptor de lipoforinas de *Ceratitis capitata* (Gene ID:101461059) presenta una mayor similitud a Lpr2. Encontramos como los sitios de corte de los diferentes péptidos señal (Figura 41 Flecha roja y línea discontinua) alinean perfectamente salvo el procedente de la especie *Ceratitis*. Hemos indicado con distinto color los aminoácidos hidrofóbicos, positivos y negativos para poder distinguir las diferentes regiones que caracterizan a los péptidos señal (recordemos que son tres: **n**, **h** y **c**) (Figura 41 Barra inferior). Nos llamó la atención la presencia en todos los casos de un aminoácido de carga positiva (Lys:K, señalado con la flecha verde en la parte superior) en la región C-terminal (**c**), dado que esta región no se caracteriza por poseer aminoácidos de esta naturaleza. Este aminoácido cargado, podría ser el responsable de la baja eficiencia de este péptido señal, pudiendo afectar a cualquier proceso durante el transporte de la proteína hacia la membrana del retículo: desde su unión con el SRP o al translocón, hasta su procesamiento.

Regulación de la actividad del péptido señal largo

Como hemos mencionado anteriormente, las isoformas que son capaces de mediar la toma de lípidos, como es el caso de la isoforma Lpr2E, se transcriben desde el promotor distal. Sólo a partir de este promotor se transcribe el dominio imprescindible para este proceso, el dominio LA1. Este dominio va siempre acompañado del dominio NCN y del péptido señal largo, sugiriendo que las funciones de estos dominios quizás estén relacionados con el proceso de toma de lípidos celular.

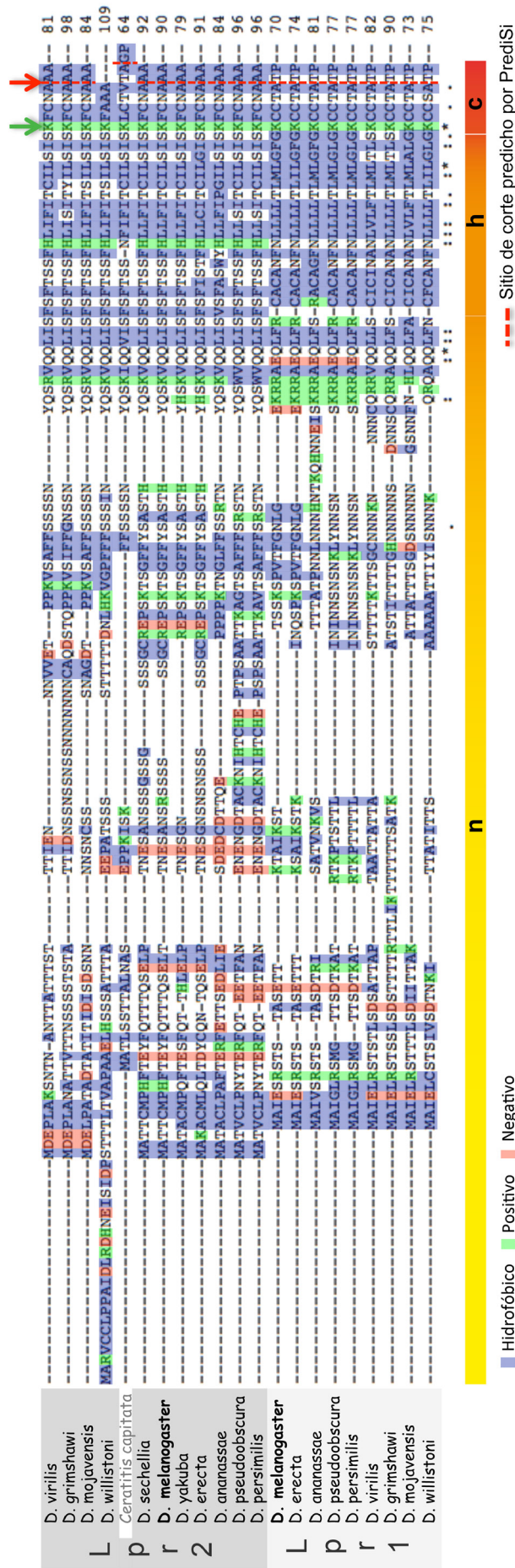


Figura 41. Alineamiento de secuencias de péptidos señal atípicamente largos procedentes de los receptores de lipoforinas (Lpr1 y Lpr2) de especies del género *Drosophila* y *Ceratitis capitata*. Resultado del alineamiento de múltiples secuencias por el servidor “Clustal W”. Los receptores de lipoforinas 1 están marcados en gris claro, mientras que los Lpr2 en gris oscuro. La especie *Drosophila melanogaster* está resaltada en negrita y las isoformas que hemos usado son Lpr2E y Lpr1H. En lila se muestran los aminoácidos hidrofóbicos (G, A, V, L, I, W, M y F), en verde con carga positiva (R, K y H) y en rojo con carga negativa (D y E). La flecha roja señala el posible sitio de corte del péptido señal predicho por PrediSi. La flecha verde indica un aminoácido atípico de carga positiva (K) presente en la región c del péptido señal de todas las especies mostradas. Los símbolos bajo las secuencias indican el tipo de alineamiento: (*) correcto, (:) residuos con propiedades estructurales y físico-químicas similares y (.) no hay coincidencia entre todas las secuencias alineadas. La barra de color bajo las secuencias muestra las distintas regiones de los péptido señal: (n) en amarillo, (h) en naranja y (c) en rojo.

Hipotetizamos que la eficiencia del péptido señal largo podría estar regulada por los niveles de lípidos celulares, actuando como un componente de retroalimentación negativa, de forma que bajos niveles de lípidos celulares llevaran a una mayor eficiencia del péptido señal largo, mayor acumulación de Lpr2E y mayor adquisición de lípidos a partir de lipoforinas circulantes. Para

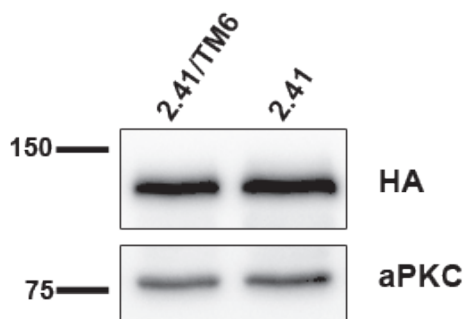


Figura 42. El péptido señal largo no se ve afectado por los niveles de lípidos celulares. Western blot de discos imaginales de ala donde se ha sobre-expresado la quimera Lpr2F-NCN-HA en fondo mutante para *lpr1* y *lpr2* (*Df(3R)lpr1/2[2.41]*) y en fondo heterocigoto para la mutación (*Df(3R)lpr1/2[2.41]/TM6*). El receptor se detectó mediante α -HA (panel superior) y como control de carga usamos la proteína aPKC (panel inferior).

analizar esta posibilidad, examinamos los niveles de la quimera *UAS-lpr2F+NCN-HA* por western blot en discos imaginales de ala en dos condiciones distintas: en fondo mutante para los receptores de lipoforinas (*Df(3R)lpr1/2[2.41]*), en el que hay un fuerte déficit de lípidos neutros celulares, y en fondo heterocigoto para esta mutación (*Df(3R)lpr1/2[2.41]/TM6b*), esencialmente silvestre en cuanto a los lípidos. Es importante recordar que la quimera *UAS-lpr2F+NCN-HA* contiene el péptido señal de Lpr2E y se expresa a niveles similares que *UAS-lpr2E* pero a diferencia de ésta, no induce la toma de lípidos por carecer del dominio LA1. Sobre-expresamos esta quimera en la zona que dará lugar al ala adulta con la línea activadora *nub-Gal4* durante 24 horas (tiempo suficiente para que haya una cantidad detectable de proteína). Vimos que la cantidad de receptor es similar en ambas condiciones (Figura 42), sugiriendo que los niveles celulares de lípidos en el disco imaginal de ala no afecta la eficiencia del péptido señal largo.

2. Interacción de los receptores de lipoforinas con sus ligandos

Estudios anteriores realizados principalmente en mamíferos han desvelado que las proteínas de la familia de los receptores LDLR tienen la capacidad de unir una amplia variedad de ligandos y como consecuencia de ello, desempeñar múltiples funciones. Esta versatilidad se debe a que sus dominios extracelulares, a pesar de estar compuestos únicamente por tres tipos básicos de dominios proteicos, éstos se encuentran repetidos y combinados de distintas formas dando lugar a ectodominios que pueden ser muy grandes y complejos. La visión más clásica establecía que los dominios LA también denominados de unión a ligando, eran los que determinaban la interacción con los ligandos extracelulares tales como las lipoproteínas, implicadas en metabolismo lipídico, o la proteína Reelin, relacionada con el desarrollo del sistema nervioso (Brown and Goldstein, 1986; Esser *et al.*, 1988; Russell *et al.*, 1989; Hiesberger *et al.*, 1999). Sin embargo, más recientemente se han ido caracterizando otros dominios que también participan en la unión de ligandos. Por ejemplo, el β -propeller del LDLR humano interacciona con los dominios LA del propio receptor (Jeon and Blacklow, 2003; Andersen *et al.*, 2013). Asimismo, el dominio EGF-A también del receptor LDL humano es el sitio de unión de la enzima PCSK9 (del inglés, *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*), que al unirse induce la degradación del receptor (Zhan *et al.*, 2007). Otro ejemplo es la proteína adaptadora Disabled 1 (Dab1), la cual interacciona con los receptores VLDLR y ApoER2 de mamíferos en

la secuencia NPxY del dominio intracelular, iniciando de este modo la cascada de señalización de la proteína Reelin (Trommsdorff *et al.*, 1998; Howell *et al.*, 1999; Ranaivoson *et al.*, 2016).

Las distintas isoformas de los receptores de lipoforinas en *Drosophila* presentan idénticos dominios extracelulares, EGF-A, EGF-B, EGF-C y β -propeller. Sin embargo, difieren en el número e identidad de los dominios LA. Por ello, es altamente probable que estos últimos determinen su capacidad de interaccionar de forma diferencial con unos ligandos u otros. En la mayoría de insectos estudiados los receptores de lipoforinas contienen 8 dominios LA, el mismo número que el VLDLR humano, (Dantuma *et al.*, 1999; Cheon *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003a; Gopalapillai *et al.*, 2006; Ciudad *et al.*, 2007; Tufail *et al.*, 2009 y Parra-Peralbo and Culi, 2011). No obstante, en el mosquito *Aedes aegypti*, la cucaracha alemana *Blattella germanica* y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* se han encontrado variantes que contienen solamente 7, de manera similar al receptor LDLR de mamíferos (Seo *et al.*, 2003; Ciudad *et al.*, 2007 y Parra-Peralbo and Culi, 2011). Esto sugiere que el número de dominios LA podría ser importante para definir su capacidad de unir ligandos específicos. Por estos motivos, para estudiar las distintas capacidades de las isoformas de los receptores de lipoforinas para unir a sus ligandos hemos elegido las isoformas Lpr2E y Lpr2F que contienen distinto número e identidades de dominios LA, siendo 8 y 7 respectivamente.

De este modo, decidimos abordar el estudio de la interacción de las diferentes isoformas de los receptores de lipoforinas con su ligando clásico, la lipoforina (Lp), así como otros dos interactores identificados en el laboratorio mediante experimentos de purificación por cromatografía de afinidad: *Lipid Transfer Particle* (LTP) y la Peroxidasina (tesis David Vaquero Escala, 2015 y Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015).

2.1. Interacción de los receptores de lipoforinas con su ligando clásico: La lipoforina

a) Interacción de los receptores de lipoforinas con la lipoforina

Desde los años 90 hasta la actualidad, varios grupos han analizado en varias especies de insectos la unión de los receptores de lipoforinas con la lipoforina, principalmente mediante ensayos de unión a ligando tipo *far western*, también denominado *ligand blotting assay*. En la mayoría de los casos, el receptor no estaba purificado sino que se utilizaba un extracto crudo de un tejido que lo expresara y los resultados no son por tanto del todo concluyentes (Lee *et al.*, 2003b). En *Drosophila*, la interacción física entre los receptores de lipoforinas y la lipoforina no ha sido demostrada. Por ello, en esta tesis abordamos este estudio mediante ensayos de co-inmunoprecipitación expresando los receptores en células S2 y en tejidos tales como las glándulas salivales y los ovarios.

En un primer experimento de co-inmunoprecipitación, la lipoforina fue inmunopurificada a partir de hemolinfa extraída de larvas silvestres mediante esferas magnéticas *dynabeads*-proteína G conjugadas a un anticuerpo anti-lipoforina generado a partir de la proteína completa (α -ApoLp FL). Como control negativo conjugamos la matriz *dynabeads*-proteína G con suero de conejo (que contiene IgG inespecíficas). La matriz cargada con lipoforina y la matriz control se incubaron con extractos de células S2 que expresaban Lpr2E o Lpr2F. En el caso de que el receptor de lipoforinas interaccione con la lipoforina unida a las *dynabeads*, formará un complejo con ésta que podrá ser identificado mediante *western blot*.

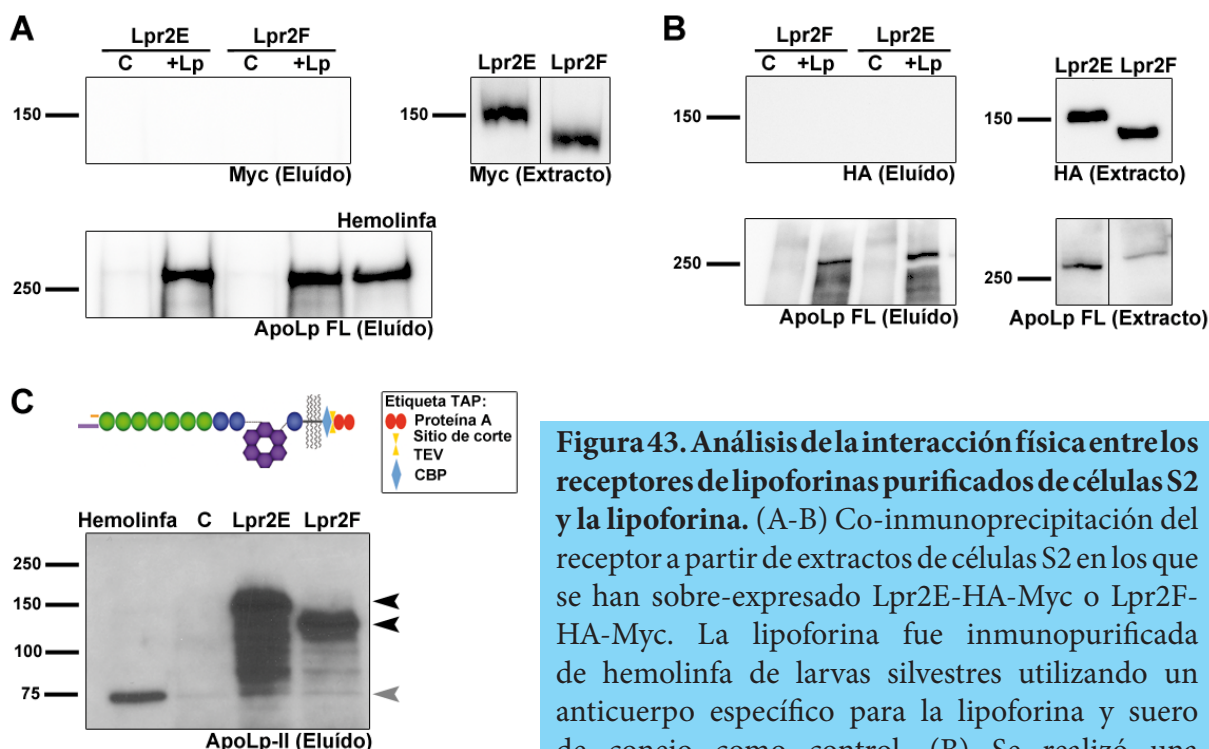


Figura 43. Análisis de la interacción física entre los receptores de lipoporinas purificados de células S2 y la lipoporina. (A-B) Co-inmunoprecipitación del receptor a partir de extractos de células S2 en los que se han sobre-expresado Lpr2E-HA-Myc o Lpr2F-HA-Myc. La lipoporina fue inmunopurificada de hemolinfa de larvas silvestres utilizando un anticuerpo específico para la lipoporina y suero de conejo como control. (B) Se realizó una pre-incubación de los extractos de células S2 que sobre-expresaban los receptores con una pequeña cantidad de hemolinfa. Los paneles superiores izquierdos muestran el revelado del eluido con (A) α -Myc o (B) α -HA de la Co-IP no observándose ninguna banda en ningún caso, y los derechos, los extractos iniciales. Los paneles inferiores muestran la cantidad de lipoporina inmunoprecipitada en el eluido detectado con α -ApoLp FL. El panel inferior izquierdo muestra la lipoporina detectada en el extracto inicial. (C) Co-IP de la lipoporina a partir de extracto de hemolinfa de larvas que expresaban los receptores solubles Lpr2E_ecto_TAP y Lpr2F_ecto_TAP en el cuerpo graso, como control usamos hemolinfa de larvas *white*. Detectamos la lipoporina utilizando el anticuerpo específico frente a la subunidad pequeña α -ApoLp-II no observando diferencias entre el control y los receptores (flecha gris). A su vez, realizamos la detección de los receptores gracias al dominio de proteína A que poseen en la etiqueta TAP (flechas negras).

pre-incubación de los extractos de células S2 que sobre-expresaban los receptores con una pequeña cantidad de hemolinfa. Los paneles superiores izquierdos muestran el revelado del eluido con (A) α -Myc o (B) α -HA de la Co-IP no observándose ninguna banda en ningún caso, y los derechos, los extractos iniciales. Los paneles inferiores muestran la cantidad de lipoporina inmunoprecipitada en el eluido detectado con α -ApoLp FL. El panel inferior izquierdo muestra la lipoporina detectada en el extracto inicial. (C) Co-IP de la lipoporina a partir de extracto de hemolinfa de larvas que expresaban los receptores solubles Lpr2E_ecto_TAP y Lpr2F_ecto_TAP en el cuerpo graso, como control usamos hemolinfa de larvas *white*. Detectamos la lipoporina utilizando el anticuerpo específico frente a la subunidad pequeña α -ApoLp-II no observando diferencias entre el control y los receptores (flecha gris). A su vez, realizamos la detección de los receptores gracias al dominio de proteína A que poseen en la etiqueta TAP (flechas negras).

Como se observa en la Figura 43A, ni Lpr2E ni Lpr2F co-inmunoprecipitaron a pesar de que estos receptores se expresaban en las células S2 de forma adecuada y de que la lipoporina permaneció unida a las *dynabeads* durante todo el proceso. Este resultado fue sorprendente ya que la lipoporina había sido descrita como ligando de los receptores de lipoporinas en varios insectos (Seo *et al.*, 2003b; Lee *et al.*, 2003; Ravikumar *et al.*, 2011). Por ello, nos preguntamos si se requeriría algún otro componente de la hemolinfa para que esta unión tuviera lugar. Realizamos un nuevo ensayo de co-inmunoprecipitación, esta vez pre-incubando lisados de células S2 que expresaban Lpr2E ó Lpr2F junto con una pequeña cantidad de hemolinfa extraída de larvas silvestres. Después de esta pre-incubación para permitir la posible formación de complejos lipoporina-receptor de lipoporina, inmunoprecipitamos los complejos mediante esferas magnéticas *dynabeads*-proteína G conjugadas a anti-lipoporina. Tampoco con estas nuevas condiciones co-inmunoprecipitó Lpr2E ó Lpr2F con la lipoporina (Figura 43B). En otra serie de experimentos expresamos los dominios extracelulares de Lpr2E y Lpr2F fusionados al módulo TAP (del inglés, *Tandem Affinity Purification*) en el cuerpo graso de larvas de *Drosophila* utilizando la línea activadora *FB-Gal4*, específica de cuerpo graso. Al

carecer de dominio transmembrana, las proteínas Lpr2E extracelular (Lpr2E_ecto_TAP) y Lpr2F extracelular (Lpr2F_ecto_TAP) se secretan y se acumulan en la hemolinfa de las larvas, donde potencialmente podrían interactuar con la abundante lipoforina presente. En estos experimentos extrajimos la hemolinfa de las larvas que expresaban Lpr2E_ecto_TAP o Lpr2F_ecto_TAP e inmunoprecipitamos los receptores de lipoforinas haciendo uso del dominio artificial TAP al que están fusionados mediante una matriz magnética conjugada a IgG. Las IgG interactúan con alta afinidad con el dominio proteína A presente en el módulo artificial TAP. En la Figura 43C pudimos comprobar que efectivamente, inmunoprecipitábamos cantidades fácilmente detectables de receptores de lipoforinas (flechas negras). Sin embargo, no vimos co-inmunoprecipitación de lipoforina superior al control negativo (hemolinfa de larvas *white*) ni con Lpr2E_ecto_TAP ni con Lpr2F_ecto_TAP (flecha gris). En algunos experimentos no mostrados incrementamos la concentración de sales en la solución de lavado desde 150 mM hasta 200 mM para facilitar la formación de complejos multiproteicos. Sin embargo, tampoco así pudimos detectar una interacción específica.

Como se ha mencionado antes, estudios realizados en varios insectos identificaron una interacción entre los receptores de lipoforinas y la lipoforina utilizando extractos crudos que contenían los receptores mediante la técnica de *far western blot*. En *Drosophila*, por su pequeño tamaño y la dificultad de extraer hemolinfa, es muy complejo purificar lipoforina a las altas concentraciones y cantidades requeridas para el uso de esta técnica. Se ha intentado en otro laboratorio, pero sin éxito (tesis de Richard Dunbar Yaffe. Universidad de Toronto, 2008). Por ello, descartamos utilizar esta técnica. La falta de interacción que observamos podría deberse a que los complejos lipoforina-receptor sólo se forman de manera eficiente en su contexto fisiológico, es decir, en la membrana plasmática y con la participación de otros posibles cofactores. Por ello decidimos cambiar la estrategia y realizar ensayos de Co-IP utilizando como material de partida tejidos larvarios en los que se sobre-expresaba Lpr2E o Lpr2F en las membranas expuestas a la hemolinfa, permitiendo de esta manera la formación de los complejos lipoforina-receptor *in vivo* en su contexto fisiológico.

Inicialmente, utilizamos las **glándulas salivales** para este ensayo ya que en Callejo *et al.*, 2008 muestran como la lipoforina co-inmunoprecipita con el receptor de membrana Patched, expresando dicho receptor en glándulas salivales, siendo por tanto, también una buena opción para nuestro estudio. En primer lugar, expresamos las isoformas *UAS-lpr2E-HA* y *UAS-lpr2F-HA* en glándulas salivales usando la línea activadora *AB.1-Gal4* (Figura 44A) y realizamos el ensayo inmunoprecipitando la lipoforina con matriz magnética conjugada al anticuerpo anti-lipoforina y detectando el receptor con anti-HA, un epítipo presente tanto en *UAS-lpr2E-HA* como en *UAS-lpr2F-HA*. Sorprendentemente, en estas condiciones la lipoforina co-inmunoprecipitó con ambos receptores, siendo esta interacción muy robusta (Figura 44B). Al contrastar notablemente este resultado con los obtenidos anteriormente, decidimos incluir en el ensayo otra proteína no relacionada como un control negativo adicional para examinar si la interacción observada podría tratarse de un artefacto. Este control negativo debía de ser una proteína de membrana que además contuviera el epítipo HA en el extremo C-terminal o Myc en la región extracelular. En la bibliografía encontramos el transgen *UAS-perdido-HA* o *KON-tiki*, siendo una proteína transmembrana localizada en los miotubos cuya función principal es la adhesión de estas células con las células tendinosas para generar una unión estable entre ellas (Schnörrer *et al.*, 2007). Estructuralmente es similar al receptor de lipoforina, presentando un gran ectodominio y una región intracelular más pequeña con la presencia del epítipo HA en el extremo C-terminal. Por consiguiente, decidimos expresar ambos receptores y Perdido en glándulas salivales y realizar la co-inmunoprecipitación en las dos direcciones posibles: inmunoprecipitando la lipoforina (Figura 44C) e inmunoprecipitando los receptores o Perdido vía el epítipo HA (Figura 44D).

El resultado muestra que Perdido aparecía en complejos con la lipoforina independientemente de la dirección de la co-inmunoprecipitación y de forma semejante a Lpr2E o Lpr2F, aunque al inmunoprecipitar los receptores y Perdido vía el epítipo HA, la cantidad de lipoforina recuperada no era muy abundante (Figura 44D). Por tanto, los receptores de lipoforinas pueden co-inmunoprecipitar con la lipoforina en determinadas situaciones experimentales a través de una interacción inespecífica. Esto podría deberse a que las lipoforinas formaran agregados proteicos, como se ha descrito en casos anteriores (Wilson *et al.*, 1991; Walsh and Atkinson, 1990) y estos agregados contuviera otras proteínas presentes en el momento de preparación del lisado celular.

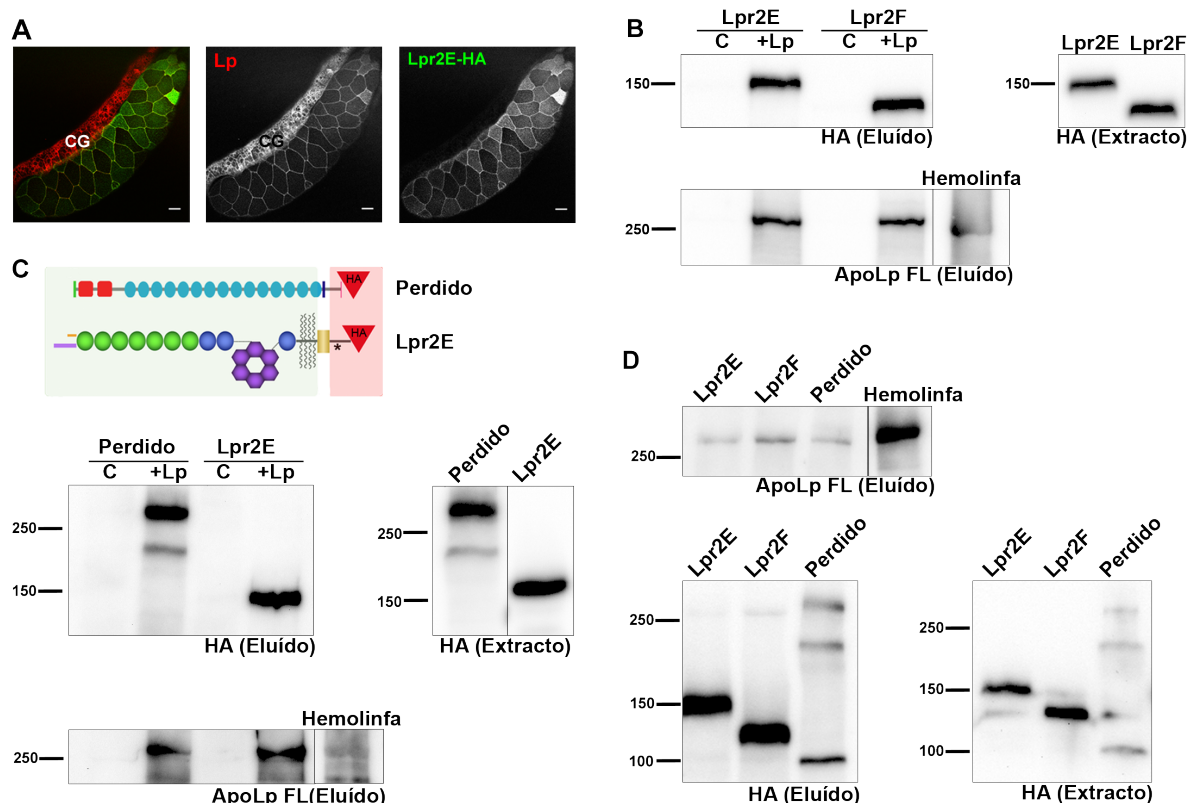


Figura 44. Análisis de la interacción física entre los receptores de lipoforinas purificados de glándulas salivales y la lipoforina. (A) Sobre-expresión de *UAS-lpr2E-HA* en glándulas salivales, usando la línea activadora *AB.1-Gal4*. La detección del receptor se realizó con α -HA en verde y la distribución de las lipoforinas con α -ApoLp FL en rojo. El receptor se localiza principalmente en las membranas de las glándulas salivales. CG: Cuerpo Graso (B-D) Co-inmunoprecipitación del receptor a partir de extractos de glándulas salivales en los que se ha sobre-expresado (B) Lpr2E-HA y Lpr2F-HA y (C) Lpr2E-HA y Perdido-HA. La lipoforina fue inmunopurificada utilizando el anticuerpo específico α -ApoLp FL y suero de conejo como control. Los paneles superiores izquierdos muestran la detección con α -HA de los receptores presentes en el eluido de la Co-IP, mostrando una fuerte interacción entre la lipoforina y los receptores, y los derechos, los extractos iniciales. Los paneles inferiores muestran la cantidad de lipoforina inmunoprecipitada del eluido detectada con α -ApoLp FL. (D) Co-IP de la lipoforina a partir de extractos de glándulas salivales en los que se ha sobre-expresado Lpr2E-HA, Lpr2F-HA o Perdido-HA. En el panel superior detectamos la lipoforina co-inmunoprecipitada con el anticuerpo α -ApoLp FL, mostrando que no hay diferencias entre los receptores de lipoforinas y Perdido. En los paneles inferiores, detectamos con α -HA los receptores procedentes del eluido (izquierda) y del extracto inicial (derecha). (D). Barra de escala: 100 μ m.

RESULTADOS

Tras los problemas que experimentamos en los ensayos a partir de glándulas salivales, decidimos utilizar los **ovarios** como tejido alternativo, ya que de forma natural expresa los receptores de lipoforinas y éstos son esenciales para la adquisición de lípidos y el correcto desarrollo de los ovarios (Parra-Peralbo and Culi, 2011). Por otro lado, el gran tamaño de los ovarios nos permitía obtener fácilmente una gran cantidad de proteína. De este modo, llevamos a cabo el ensayo sobre-expresando los transgenes *UASp-lpr2E-HA* y *UASp-lpr2F-HA* en la línea germinal usando la línea activadora *V32-Gal4* (Figura 45A). Realizamos Co-IPs en las dos direcciones posibles: inmunoprecipitando la lipoforina (Figura 45B) e inmunoprecipitando el receptor (Figura 45C). El resultado fue muy parecido al obtenido utilizando las glándulas salivales como tejido de partida, observando una fuerte co-inmunoprecipitación en el primer caso (Figura 45B) y débil en el segundo (Figura 45C). Desafortunadamente no nos fue posible encontrar una proteína que pudiera usarse de control negativo y cuya expresión pudiera dirigirse a los ovarios, es decir, que estuviera clonado en el plásmido UASp. Por tanto, es difícil concluir si la inmunoprecipitación detectada se corresponde a una interacción específica.

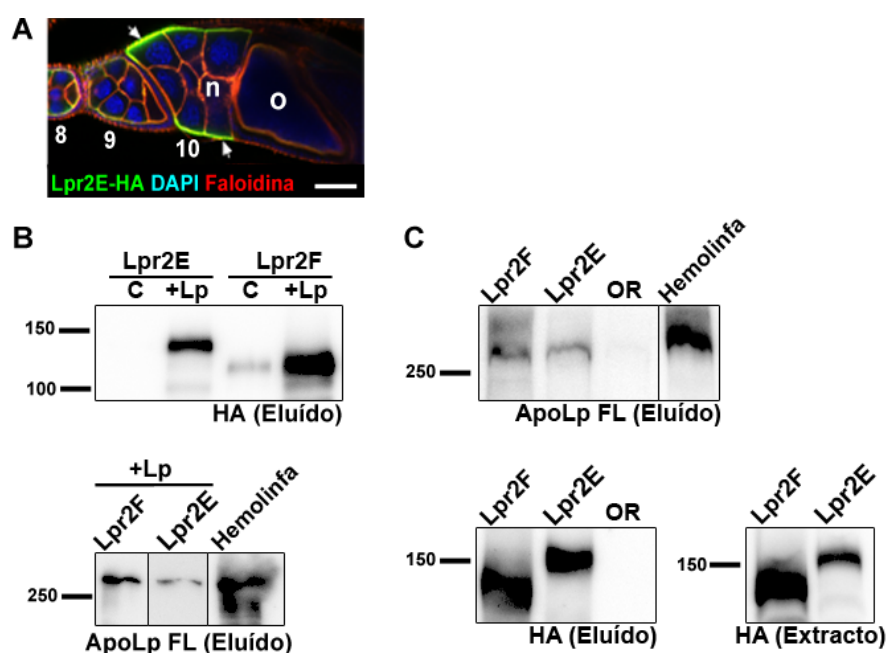


Figura 45. Análisis de la interacción física entre los receptores de lipoforinas purificados de ovarios y la lipoforina. (A) Sobre-expresión de *UASp-lpr2E-HA* en la línea germinal de los ovarios usando la línea activadora *V32-Gal4*. La detección del receptor se realizó con α -HA en verde, la faloidina en rojo para mostrar la morfología del tejido y los núcleos teñidos con DAPI en azul. El receptor se acumula fundamentalmente en las membranas de las células nutricias (flechas) del estadio 10. **n**: células nutricias, **o**: oocito. Barra de escala: 100 μ m. Co-inmunoprecipitación del receptor (B) o de la lipoforina (C) a partir de extractos de ovarios en los que se ha sobre-expresado *UASp-lpr2E-HA* o *UASp-lpr2F-HA* en la línea germinal. La lipoforina (B) y los receptores (C) fueron inmunopurificados utilizando el anticuerpo específico α -ApoLp FL y α -HA respectivamente. Como controles se usaron suero de conejo en (B) y extracto de ovarios Oregon R (OR) en (C). Los paneles superiores muestran (B) la detección con α -HA de los receptores co-inmunoprecipitados, apareciendo una banda con ambos receptores. (C) La lipoforina con α -ApoLp FL, mostrando como la señal con el control es más débil que con los receptores. En los paneles inferiores detectamos (B) con α -ApoLp FL la cantidad de lipoforina inmunoprecipitada y (C) con α -HA los receptores procedentes del eluido (izquierda) y del extracto inicial (derecha).

El conjunto de todos estos resultados nos sugiere que la interacción del receptor de lipoforina con la lipoforina es muy débil y/o transitoria. Esto concuerda con las constantes de disociación calculadas para el LDLR humano, que son medias-altas.

Una vez realizados los ensayos bioquímicos, quisimos ampliar el estudio de esta interacción mediante experimentos *in vivo*. En Parra-Peralbo and Culi, 2011, describen como la expresión de la isoforma Lpr2E estabiliza extracelularmente la lipoforina. Esto sugiere que al menos Lpr2E debe interaccionar de alguna forma con la lipoforina, aunque pueda ser de forma indirecta. Para comparar la capacidad de las distintas isoformas en mediar esta estabilización y conocer qué dominios proteicos son relevantes para llevarla a cabo, sobre-expresamos en el compartimento posterior de discos imaginales de ala *UAS-lpr2E-HA*, *UAS-lpr2F-HA* así como quimeras en las que dominios específicos de Lpr2E y de Lpr2F se intercambiaron, usando la línea activadora *hh-Gal4*. En estos experimentos inhibimos la endocitosis durante las 3 horas previas a la disección utilizando para ello el alelo termosensible de *shibire* (*shi^{ts}*), homólogo de la dinamina humana. La falta de función de *shi* impide la escisión de las vesículas endocíticas de la membrana plasmática. En estas condiciones, al inhibirse la endocitosis, se produce una acumulación de receptores en la membrana plasmática, incluyendo los receptores sobre-expresados Lpr2E y Lpr2F, y con ello también se acumulan sus ligandos. De esta forma se sensibiliza el ensayo, permitiendo detectar interacciones receptor-ligando por inmunohistoquímica que no serían detectables de otra forma.

Los resultados muestran como la expresión de la isoforma Lpr2E induce una importante acumulación de lipoforina principalmente en la membrana basolateral (Figura 46B). Por el contrario, esta acumulación es bastante menor al expresar la isoforma Lpr2F (Figura 46A). Estas diferencias no se deben a que Lpr2E y Lpr2F se expresen a distintos niveles ya que cuando examinamos la cantidad de receptor en la membrana plasmática realizando un protocolo de inmunotinción que únicamente detecta los epítomos extracelulares, observamos como ambas isoformas se acumulaban con niveles similares, localizándose principalmente en la membrana basolateral (Figura 34A-A').

Para identificar los módulos proteicos presentes en Lpr2E que le confieren esta alta capacidad para estabilizar la lipoforina, examinamos distintas proteínas quiméricas. Cuando añadimos el dominio LA1 a Lpr2F observamos un ligero aumento de la acumulación de lipoforina (Figura 46C). Sin embargo, la adición de LA1+ED o la región N-terminal completa de Lpr2E (LA1+NCN), confieren la misma capacidad de acumular lipoforinas que la isoforma Lpr2E (Figura 46D y F, respectivamente). El dominio LA1 es esencial para esta acumulación, ya que la quimera que contiene el dominio NCN y carece del LA1 (Lpr2F+NCN) induce la estabilización de lipoforina de forma parecida a Lpr2F (Figura 46E).

Estos resultados sugieren que ambas isoformas inducen la acumulación o estabilización extracelular de la lipoforina *in vivo*, aunque esta capacidad se ve incrementada por la presencia del dominio LA1 de la isoforma Lpr2E, siendo éste fundamental para la estabilización robusta de la lipoforina. Además, el módulo ED potencia aún más la capacidad para estabilizar la lipoforina. En Parra-Peralbo and Culi, 2011 se demostró que el dominio LA1 era también primordial para que la toma de lípidos tuviera lugar. Por lo tanto, es posible que esta estabilización extracelular de lipoforina tenga una relación directa con la adquisición celular de lípidos.

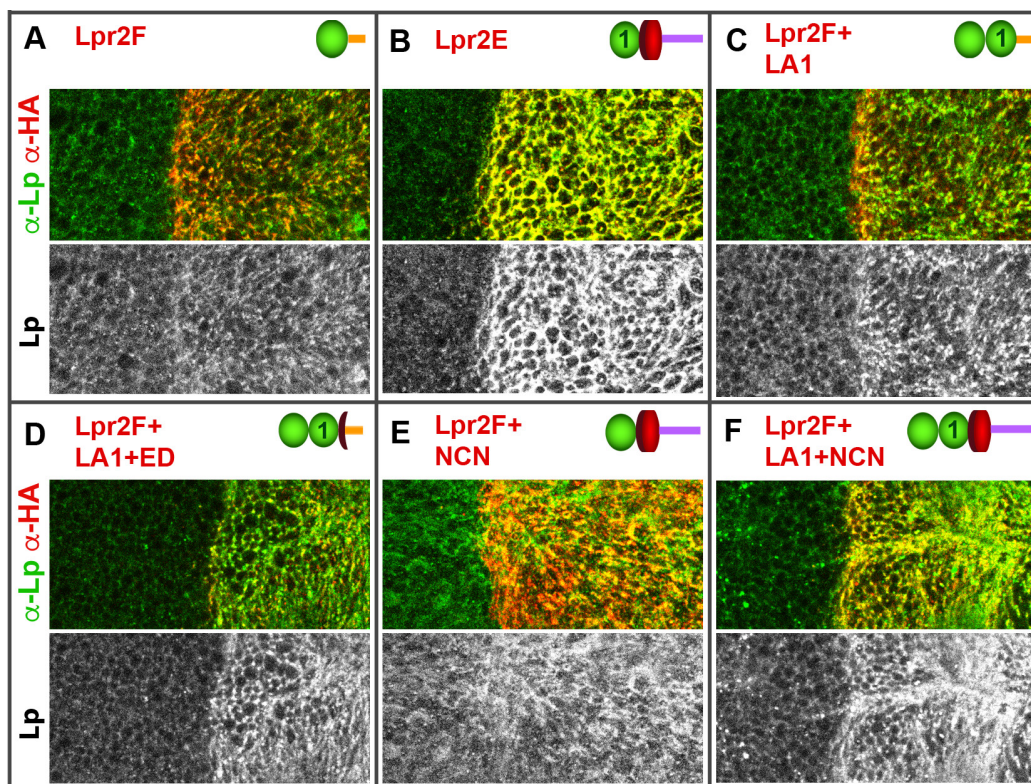


Figura 46. Los dominios LA1 y ED de los receptores de lipoforinas se requieren para una robusta estabilización de la lipoforina en discos imaginales de ala. (A-F) Discos imaginales de ala expresando en el compartimento posterior diferentes isoformas y quimeras de los receptores de lipoforinas según se indica. Todas las imágenes fueron tomadas en un plano basal. La detección del receptor y las quimeras se realizó con α -HA en rojo, la lipoforina se muestra en verde y también en gris en un canal desglosado (en el panel inferior). Todas las inmunotinciones fueron realizadas después de bloquear la endocitosis durante 2,5 horas. Barra de escala: 10 μ m. Todos los paneles se muestran al mismo aumento.

b) Efecto de la expresión de los receptores de lipoforinas sobre la endocitosis de lipoforina

En mamíferos, el receptor LDLR desempeña un papel fundamental en el metabolismo lipídico, ya que capta las lipoproteínas circulantes ricas en colesterol (LDL) y las internaliza en la célula por un proceso de endocitosis mediada por clatrina (Brown and Goldstein, 1986). De manera similar, se ha descrito como los homólogos de estos receptores en insectos, los receptores de lipoforinas, son capaces de endocitar lipoforina en células transfectadas en cultivo y en el cuerpo graso (Dantuma *et al.*, 1999; Van Hoof *et al.*, 2003; 2005). Del mismo modo, se ha visto que Lpr1 en *Drosophila* endocita la serpina *necrotic* (Soukup *et al.*, 2009) y ambos receptores, Lpr1 y Lpr2, cuando se sobre-expresan en discos imaginales de ala inducen la endocitosis de la lipoforina (Callejo *et al.*, 2008 y Khaliullina *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de que los receptores son capaces de endocitar estas lipoproteínas, a diferencia del receptor LDL humano, la toma de lípidos neutros en *Drosophila* tiene lugar por un proceso independiente de endocitosis (Parra-Peralbo and Culi, 2011). Confirmamos estos datos bloqueando la endocitosis durante 8 horas en

clones de *shi^{ts}* en discos imaginales de ala. No observamos cambios en el patrón de acumulación de lípidos (Figura 47D).

Por esta razón, decidimos comparar la capacidad de endocitar la lipoforina de las isoformas Lpr2E y Lpr2F. Para ello, los transgenes *UAS-lpr2E-HA* y *UAS-lpr2F-HA* se sobre-expresaron en el compartimento posterior de discos imaginales de ala junto con el marcador de endosomas tempranos *UAS-rab5-GFP*. En la Figura 47A-C, se observa como ambas isoformas inducen la endocitosis de lipoforinas y que además, estas vesículas, co-localizan parcialmente con el marcador de endosomas tempranos Rab5-GFP. Es importante resaltar que la mayor parte de la endocitosis de lipoforinas tiene lugar en la zona apical, tal como se observó anteriormente en Callejo *et al.*, 2008. Esto contrasta con el hecho de que la mayor parte de la lipoforina estabilizada extracelularmente tenga lugar en la región basolateral (Figura 46A-F).

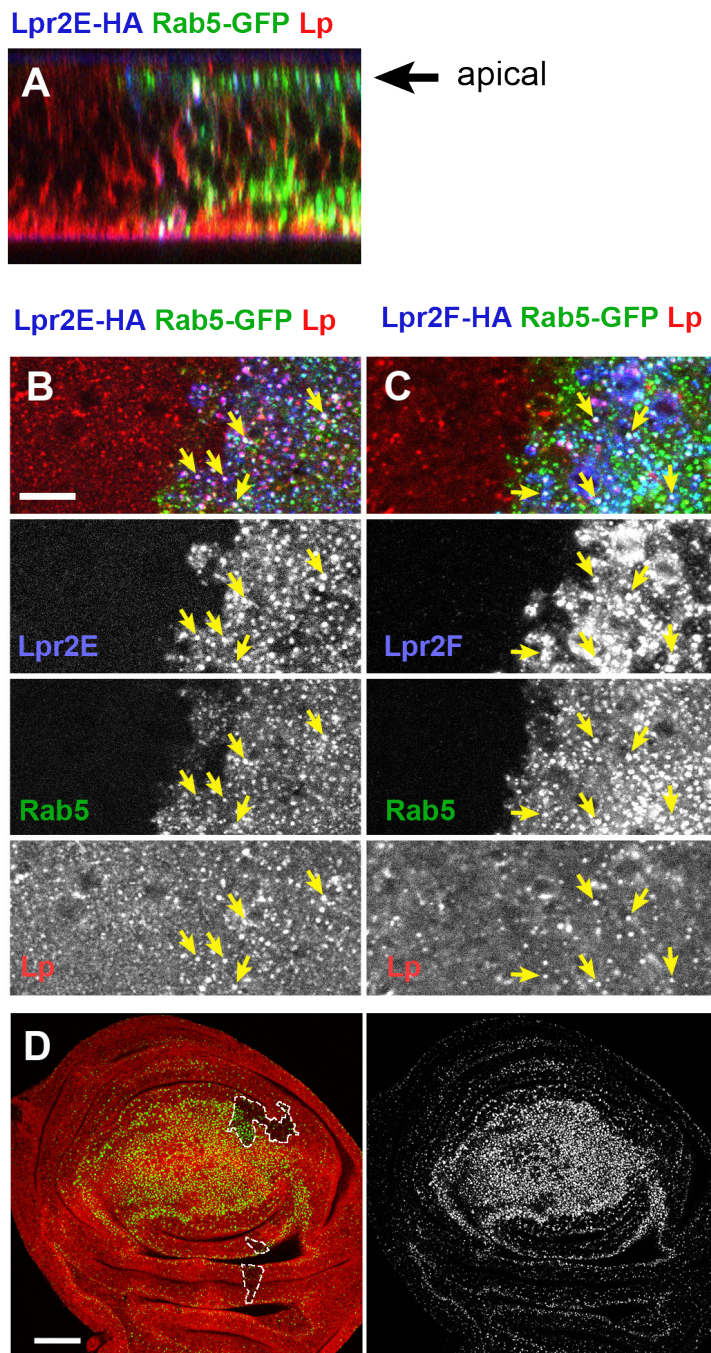


Figura 47. Los receptores de lipoforinas median la endocitosis de lipoforina en discos imaginales de ala. *UAS-rab5-GFP* y *UAS-lpr2E-HA* (A y B) o *UAS-lpr2F-HA* (C) fueron co-sobre-expresados en el compartimento posterior de discos imaginales de ala usando la línea activadora *en-Gal4*. Los receptores de lipoforinas fueron detectados con α -HA en azul, Rab5-GFP en verde y la lipoforina en rojo. Todos se muestran en un canal desglosado. Sección transversal (A) y secciones apicales (B y C) de discos imaginales de ala. Se aprecian múltiples vesículas conteniendo lipoforina, Rab5 y el receptor (flechas amarillas), demostrando que tanto Lpr2E como Lpr2F inducen la endocitosis de lipoforinas. (D) Discos imaginales de ala conteniendo clones de *shits* homocigotos. Los clones se identificaron por la ausencia del marcador GFP (rojo) y son resaltados con unas líneas. Los lípidos neutros están teñidos con Nile Red (verde) y mostrados en un canal desglosado. No hay cambios en el patrón de acumulación de los lípidos. Barra de escala: 10 μ m (A-C) y 100 μ m en D.

Para estudiar en detalle la endocitosis de las partículas de lipoforinas y su maduración en endosomas a lo largo del tiempo, realizamos un experimento utilizando una línea activadora Gal4 que contiene el promotor inducible de la chaperona Hsp70, denominada *heat shock-Gal4* (*hs-Gal4*). Esta línea activadora nos permite inducir la transcripción del factor Gal4 y por tanto también del receptor de lipoforinas bajo control de las secuencias UAS, de manera controlada temporalmente.

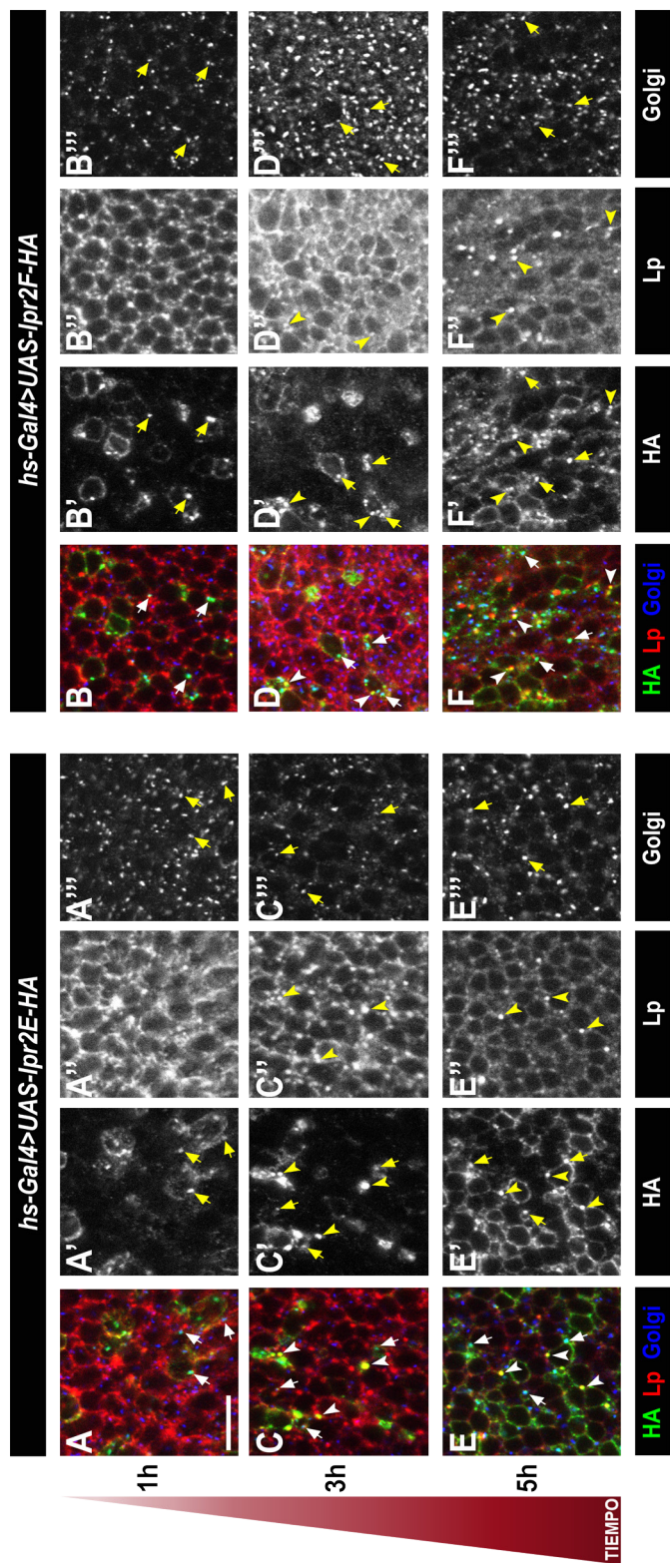


Figura 48. A tiempos cortos, Lpr2E y Lpr2F median la endocitosis de lipoforinas de forma semejante. (A-F) Expresión de Lpr2E y Lpr2F en discos imaginales de ala tras un choque térmico de 1 hora a 37°C usando la línea activadora *hs-Gal4* y 1 hora (A-B), 3 horas (C-D) o 5 horas (E-F) de recuperación. El receptor se muestra con α -HA en verde, la lipoforina en rojo y el aparato de Golgi mediante un anticuerpo específico α -Golgi en azul. Todos los canales se muestran desglorados. La co-localización del receptor con el aparato de Golgi y con la lipoforina se indican con flechas o cabeza de flechas respectivamente. Barra de escala: 20 μ m. Todos los paneles se muestran al mismo aumento.

En nuestro caso, realizamos un choque térmico de 1 hora a 37°C. Después de 1, 3 y 5 horas de recuperación analizamos tanto la distribución de los receptores de lipoforinas como de la lipoforina. Para llevar a cabo un mejor control de la proteína, marcamos el aparato de Golgi con un anticuerpo específico y así poder estimar la cantidad de receptor localizado en este orgánulo.

De esta manera, después de la hora de inducción, tanto Lpr2E como Lpr2F, se encuentran en vías de secreción ya que gran parte de las vesículas co-localizan con el Golgi (Figura 48 Flechas en A-A'' y B-B''). A partir de las 3 horas, se observan vesículas endocíticas que contienen tanto el receptor como la lipoforina (Figura 48 Cabeza de flechas en C-F), aunque sigue habiendo parte de receptor en el Golgi (Figura 48 Flechas en C-F). Con este experimento podemos concluir que ambas isoformas llegan a la membrana plasmática y comienzan a endocitar la lipoforina en unas 3 horas después de activarse su transcripción. Más importante, vemos que a tiempos muy cortos ambos receptores tienen capacidades similares de endocitar lipoforina. Esto contrasta con la cantidad de vesículas endocíticas que contienen lipoforina en una situación de expresión continuada de Lpr2E o Lpr2F, mucho mayor en el caso de Lpr2F (no mostrado). Nuestros datos sugieren que esa diferencia no se debe a que Lpr2F tenga mayor capacidad de inducir endocitosis de lipoforina sino a que se expresa a mayores niveles.

2.2. Interacción de los receptores de lipoforinas con la lipoproteína *Lipid Transfer Particle* (LTP)

En insectos, el intercambio de lípidos entre tejidos está mediado por la lipoforina, siendo ésta la lipoproteína más abundante en la hemolinfa. Se ha visto que en *Drosophila* la lipoforina transporta el 95% de los lípidos presentes en la hemolinfa (Palm *et al.*, 2012). Adicionalmente, ya hemos descrito en la introducción como los receptores de lipoforinas desempeñan un papel fundamental en la toma celular de lípidos en varios tejidos (Parra-Peralbo and Culi, 2011). Sin embargo, se desconoce cuál es el mecanismo molecular mediante el cual los lípidos neutros presentes en la lipoforina se internalizan en las células.

Para descubrir nuevas proteínas involucradas en este proceso, en el laboratorio se inició una búsqueda de proteínas que interaccionaran específicamente con los receptores de lipoforinas mediante ensayos de purificación por cromatografía de afinidad. Uno de los ligandos identificados se unía específicamente a la isoforma Lpr2E, que recordemos que es la isoforma capaz de mediar la toma de lípidos, y no interaccionaba con la isoforma Lpr2F (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015). Este ligando se denomina en inglés *Lipid Transfer Particle* (LTP) y es una lipoproteína circulante, aunque mucho menos abundante que la lipoforina (Palm *et al.*, 2012). Estudios en *Drosophila* y otros insectos han mostrado que esta partícula, con actividad catalítica, promueve la transferencia de lípidos neutros desde el intestino medio a la lipoforina, y desde la lipoforina al cuerpo graso y ovarios (Canavoso *et al.*, 2005; Palm *et al.*, 2012). Por tanto, es un firme candidato para esclarecer como tiene lugar la adquisición de lípidos en *Drosophila*.

Para confirmar la interacción de los receptores de lipoforinas con el LTP, realizamos un experimento de co-inmunoprecipitación. Para ello, expresamos las isoformas Lpr2E y Lpr2F en células S2 e incubamos estos extractos con esferas magnéticas *dynabeads*-proteína G acomplexadas con α -HA. Seguidamente, esta matriz cargada con Lpr2E o Lpr2F se incubó con hemolinfa diluida de larvas silvestres y que por tanto, contiene LTP. Por último, detectamos la interacción con un anticuerpo específico frente a ApoLTP-II. Como muestra la Figura 49A, el LTP se une eficientemente a la isoforma Lpr2E, mientras que con Lpr2F no observamos

interacción alguna. Este resultado confirma que el LTP es un ligando específico de las isoformas que son capaces de mediar la toma de lípidos, indicando que podría ser un factor fundamental para este proceso. Además, es importante destacar que bajo las mismas condiciones en las que detectamos la interacción de Lpr2E con el LTP, no detectamos interacción ni de Lpr2E ni de Lpr2F con la lipoforina, a pesar de que la lipoforina es más abundante que el LTP en la hemolinfa (Figura 49A). Estos resultados, sumados a los del apartado anterior (ver Figuras 43, 44 y 45), demuestran que Lpr2E presenta mayor afinidad por LTP que por la lipoforina.

a) Lpr2E promueve la acumulación extracelular de LTP en la membrana basolateral así como su endocitosis

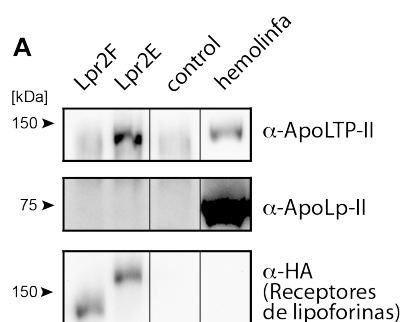
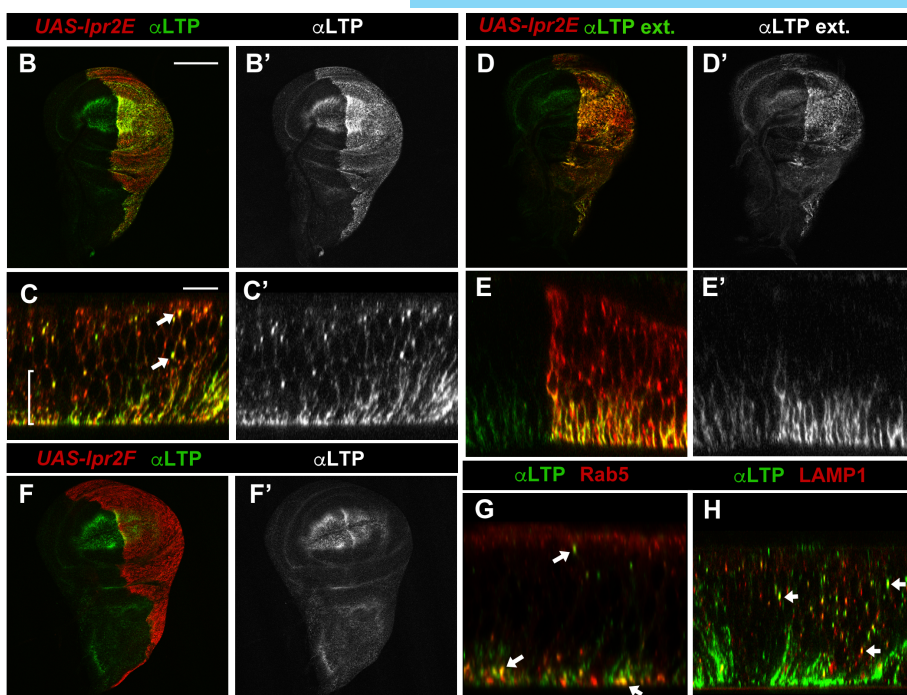


Figura 49. El LTP es un ligando para algunas isoformas de los receptores de lipoforinas. (A) Co-inmunoprecipitación del LTP (superior) y lipoforina (intermedio) con Lpr2E, Lpr2F o matriz virgen (control), analizado mediante *western blot*. Lpr2E y Lpr2F contienen el epítipo HA y fueron purificadas a partir de células S2 transfectadas, incubadas con hemolinfa diluida e inmunoprecipitadas con α-HA. La cantidad de receptor en el eluido se muestra en el panel inferior. La última fila se corresponde



con hemolinfa diluida. (B-E) Sobre-expresión de Lpr2E en el compartimento posterior de discos imaginales de ala (*hh-Gal4*), detectado con α-HA en rojo. (B y D) Secciones ópticas de la región basal y (C y E, dominio apical arriba) secciones transversales de los discos imaginales de ala. El LTP (en verde y en un panel desglosado) se acumula a altos niveles tanto en membranas basolaterales (llave) como en

vesículas (flechas), co-localizando con Lpr2E (C y C'). (D-E) Inmunotinción realizada con un protocolo específico para detectar proteínas extracelulares mostrando el LTP (verde, y en un panel desglosado) en membranas basolaterales del primordio del ala y a altos niveles en el compartimento posterior, donde Lpr2E es sobre-expresado. (F) Discos imaginales de ala expresando Lpr2F (rojo) en el compartimento posterior (*hh-Gal4*). La distribución del LTP (verde y en un panel desglosado) en la región basal del disco no es modificada por la sobre-expresión de Lpr2F. (G-H) Secciones transversales de discos imaginales de ala mostrando la zona del primordio del ala donde se co-expresan *UAS-lpr2E-HA* y *UAS-rab5-GFP* (G) o *UAS-lamp1-GFP* (H). El LTP (verde) se encuentra en vesículas endocíticas (flechas) que parcialmente co-localizan con Rab5 (G, en rojo) y LAMP1 (H, en rojo). B, D y F se muestran al mismo aumento. Barra de escala: 20 μm. C, E, G y H están al mismo aumento. Barra de escala: 10 μm.

Una vez confirmada *in vitro* la fuerte interacción de la isoforma Lpr2E con el LTP, empezamos a analizar la relevancia funcional de esta interacción. En primer lugar, quisimos ver si Lpr2E puede mediar la endocitosis de LTP *in vivo*. Para ello, sobre-expresamos los receptores de lipoforinas en discos imaginales de ala, un tejido donde se ha observado que su actividad es relevante para el proceso de adquisición de lípidos. La sobre-expresión de la isoforma Lpr2E induce una acumulación de LTP principalmente en la región basolateral de las células del epitelio y en múltiples vesículas (Figura 49B y C). Estas vesículas co-localizan parcialmente con marcadores de endosomas tempranos (Rab5) y lisosomales (LAMP1) indicando distintos estadios de endocitosis del LTP (Figura 49G y H). Por otra parte, la acumulación de LTP en la región basolateral parece principalmente extracelular. Confirmamos que era así mediante el uso de un protocolo de inmunotinción que únicamente detecta epítomos extracelulares (Figura 49D y E). Por otra parte, comprobamos que como era de esperar, la sobre-expresión de la isoforma Lpr2F no inducía acumulación del LTP o su endocitosis (Figura 49F).

b) Los receptores de lipoforinas se requieren para la acumulación de LTP en las membranas plasmáticas de ovarios y discos imaginales en animales silvestres

Sabemos que los receptores de lipoforinas se expresan de manera endógena en ovarios adultos y en discos imaginales de ala donde son de vital importancia para la acumulación de lípidos. Por esta razón, decidimos examinar la distribución del LTP en estos tejidos y analizar si dependía de la presencia de los receptores de lipoforinas. Vimos que en ovarios silvestres, el LTP empieza a acumularse en las membranas de las células nutricias (*nurse cells*) en estadio 9, aunque de manera más importante en estadio 10, coincidiendo con el patrón de expresión de los receptores de lipoforinas (Figura 50A-A'). En ausencia de uno *Df(3R)lpr2[1.40]* o de ambos receptores *Df(3R)lpr1/2[2.41]* observamos como la mayor parte del LTP desaparece, aunque sigue habiendo cierta acumulación en la superficie de las células foliculares que recubren el oocito (Figura 50B y C, respectivamente). Esto demuestra que el gen *lpr2* es fundamental para la acumulación del LTP en los ovarios adultos.

De la misma manera, examinamos la distribución del LTP en discos imaginales de ala de larvas silvestres de tercer estadio, donde se puede apreciar como se acumula fundamentalmente en el primordio del ala, la región de máxima expresión de *lpr1* y *lpr2* (Parra-Peralbo, y Culi, 2011) (Figura 50D). Al examinar en detalle esa región, pudimos observar en un corte transversal como el LTP se localiza principalmente en membranas basolaterales y algunas vesículas, recordando la distribución que ya habíamos visto después de sobre-expresar Lpr2E. Cuando examinamos discos de ala mutantes para los receptores de lipoforinas (*Df(3R)lpr1/2[2.41]*), no detectamos acumulación de LTP (Figura 50E). Ello demuestra que los receptores de lipoforinas también median la acumulación del LTP en la zona del primordio de ala de los discos imaginales.

c) La toma de lípidos en discos imaginales de ala y ovarios requiere que el LTP se acumule en la membrana plasmática

Nuestros datos indican que en tejidos donde tienen lugar la toma de lípidos, ovarios y discos imaginales de ala (Figura 50F e I respectivamente), se aprecia acumulación de LTP en la membrana plasmática de las células. Ello sugiere que esta lipoproteína puede desempeñar un papel en el proceso. Para averiguar si era así, realizamos un experimento en el que redujimos la

cantidad de LTP circulante en la hemolinfa y examinamos si ello afectaba el contenido lipídico de los ovarios y de los discos imaginales. Para ello expresamos un ARN interferente contra el gen *apoLTP* (*UAS-apoLTP-i*) en el cuerpo graso, el tejido donde se sintetiza el LTP (Palm *et al.*, 2012), mediante la línea activadora *Cg-Gal4*. Limitamos temporalmente la expresión de este transgen a la fase adulta, para examinar los ovarios, o a la fase larvaria para examinar los discos imaginales, mediante el uso del sistema *Gal80^{ts}*.

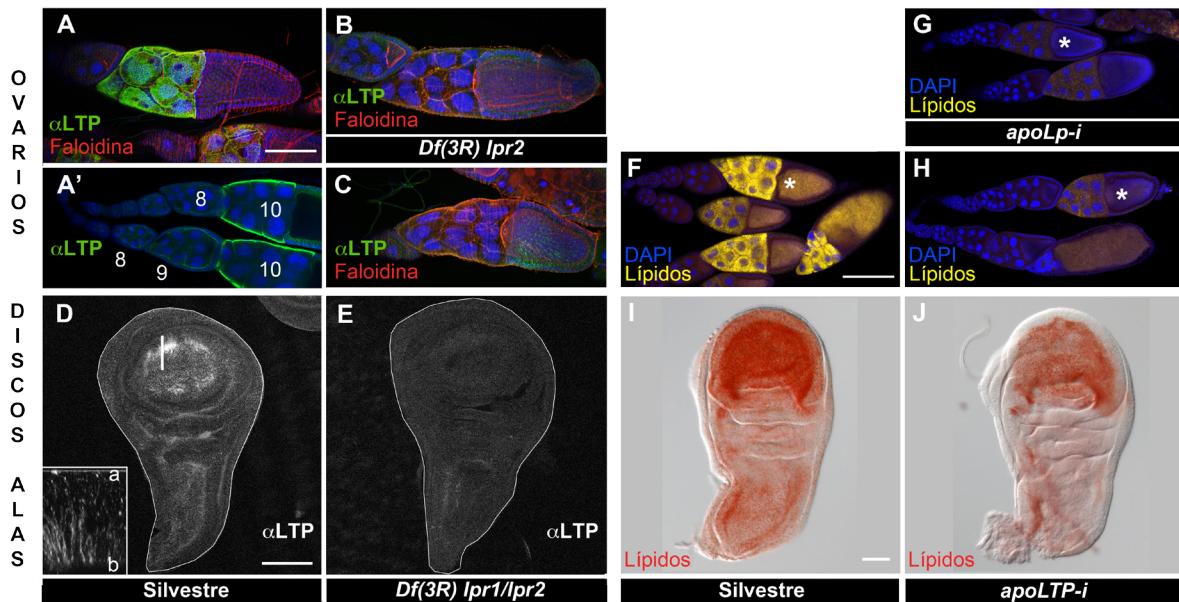


Figura 50. Los receptores de lipoforinas se requieren para la acumulación del LTP en ovarios y discos imaginales de ala, y éste a su vez se requiere para la toma de lípidos neutros en ambos tejidos. (A-C) Cámaras del huevo con genotipo (A) silvestre, (B) *Df(3R)lpr2*[1.40] y (C) *Df(3R)lpr1/2*[2.41], mostrando la distribución del LTP (en verde), F-actina (faloidina, en rojo) y los núcleos (DAPI, en azul). A, B y C se corresponden con proyecciones de intensidad máxima de una mitad de la cámara del huevo (50 μ m). A' muestra un plano óptico donde se observa como el LTP se acumula en la superficie de las células nutricias. El LTP comienza a acumularse en el estadio 9 y fuertemente en el estadio 10. (D-E) Discos imaginales de ala con genotipo (D) silvestre y (E) *Df(3R)lpr1/2*[2.41] mostrando la distribución del LTP. El LTP está ausente en discos doble mutantes para los receptores de lipoforinas. En D se muestra una magnificación (4.5x) de la región del disco marcada con una línea donde se aprecia un corte transversal (a: apical, b: basal). El LTP se acumula principalmente en las membranas basolaterales. Los discos imaginales de ala se han resaltado con una fina línea blanca. (F-H) Ovariolas conteniendo cámaras del huevo en estadios progresivos del desarrollo, los más maduros a la derecha. Los lípidos neutros están teñidos con Nile Red en amarillo y los núcleos con DAPI en azul. Los asteriscos indican cámaras del huevo vitelogénicos en estadios equivalentes del desarrollo (10b). (F) Silvestre. (G) *apoLp* fue silenciado en el cuerpo graso durante 6 días previos a la disección en ovarios expresando *UAS-apoLp-i* (*Cg-Gal4*). (H) *apoLTP* fue silenciado de manera similar en el cuerpo graso durante 2 días previos a la disección. Se requirió del uso del sistema *Gal80^{ts}* para el control temporal. (I-J) Discos imaginales de ala mostrando los lípidos teñidos con Oil red O. (I) Silvestre (J) *apoLTP* fue silenciado en el cuerpo graso expresando *UAS-apoLTP-i* (*Cg-Gal4*) durante 4 días. Las larvas fueron seleccionadas en estadio prepupa, que es fácilmente reconocible y dura tan solo unas horas. A-C y D-E están al mismo aumento. Barra de escala: 10 μ m. F-G e I-J se muestran al mismo aumento. Barra de escala: 100 μ m.

Observamos que al activar *UAS-apoLTP-i* en el cuerpo graso de adultos, la fertilidad de las hembras se redujo tras 2 días de expresión del ARNi. Al examinar los ovarios de estas hembras, observamos algunos folículos degenerando. Además, los folículos que no degeneraron mostraban una clara reducción del contenido lipídico intracelular (Figura 50 Comparar F con H). Un fenotipo similar se obtiene al silenciar la lipoforina mediante ARNi (Figura 50G), sugiriendo que ambas lipoproteínas son esenciales para el proceso de toma de lípidos durante la ovogénesis.

Para examinar la falta de función de LTP en discos imaginales de ala usamos la misma estrategia salvo que expresamos el ARN interferente contra *apoLTP* durante un periodo de 4 días durante el estadio larvario. La expresión continuada de *UAS-apoLTP-i* produce un retraso en el crecimiento de la larva y puede llegar a bloquear la pupación. Por tanto, para comparar de forma eficaz las larvas que tuvieran las mismas características en cuanto a tamaño y madurez en el desarrollo, extrajimos los discos imaginales exclusivamente de larvas en la fase de prepupa, fácilmente identificable morfológicamente por tener el primordio de ala parcialmente evertido y que únicamente dura unas pocas horas. Esto es especialmente importante ya que la acumulación de inclusiones lipídicas en el disco imaginal de ala aumenta mucho durante el tercer estadio tardío. Los discos de ala de las larvas *UAS-apoLTP-i* mostraron niveles reducidos de lípidos en comparación con los discos silvestres (Figura 50 Comparar I con J), demostrando la importancia del LTP en la toma de lípidos, también en los discos imaginales de ala.

Todos estos resultados sugieren que la interacción del LTP con los receptores de lipoforinas es necesaria para la adquisición de lípidos neutros en ovarios y discos de imaginales de ala.

d) Mapeo de los dominios de interacción de Lpr2E con el LTP

El hecho de que la isoforma Lpr2E pero no Lpr2F pueda interaccionar físicamente con el LTP, claramente indica que algunos de los dominios proteicos presentes específicamente en Lpr2E son los responsables de esta interacción. Hemos descrito anteriormente como los dominios LA1 junto con el ED de Lpr2E son los responsables de estabilizar extracelularmente la lipoforina. Por ello, nos preguntamos si la misma región N-terminal es también la responsable de la interacción con el LTP. Para responder a esta cuestión hicimos uso de los receptores quiméricos en los que habíamos intercambiado dominios entre las isoformas Lpr2E y Lpr2F. De esta manera, sobre-expresamos la quimera Lpr2F+LA1+NCN, que contiene la región N-terminal de la isoforma Lpr2E fusionada a Lpr2F, en el compartimento posterior del disco imaginal de ala. Observamos en la Figura 51E, como el LTP se acumula en las membranas basolaterales, al igual que ocurre con Lpr2E (Figura 51A). Esto evidencia que efectivamente la unión con el LTP ocurre en esa región. Como se había demostrado previamente en el laboratorio que el dominio LA1 era esencial para la toma de lípidos, examinamos si este dominio también presenta afinidad por el LTP. Expresamos la quimera Lpr2F+LA1 en el disco imaginal de ala, pero en este caso, no se detectó ninguna acumulación del LTP (Figura 51F). Sin embargo, la adición de 16 aminoácidos que llamamos ED (*Extension domain*) a Lpr2F+LA1, en la quimera Lpr2F+LA1+ED, le confirió una fuerte capacidad de unión al LTP (Figura 51I). Por el contrario, la quimera que carece del dominio LA1, Lpr2F+NCN, no acumula LTP, al igual que la isoforma Lpr2F (Comparar Figura 51J con B). Estos resultados nos muestran como el dominio LA1 extendido (LA1+ED) proporciona a la isoforma Lpr2E la capacidad de unión al LTP.

Para aumentar la sensibilidad del ensayo, llevamos a cabo un experimento similar pero en el que inhibimos la endocitosis utilizando para ello el alelo termosensible de shibire (*shi^{ts}*), tal como describimos en un apartado anterior. De esta manera, tanto el receptor como los posibles ligandos (entre ellos el LTP) se acumulan a mayores niveles en las membranas, facilitando su

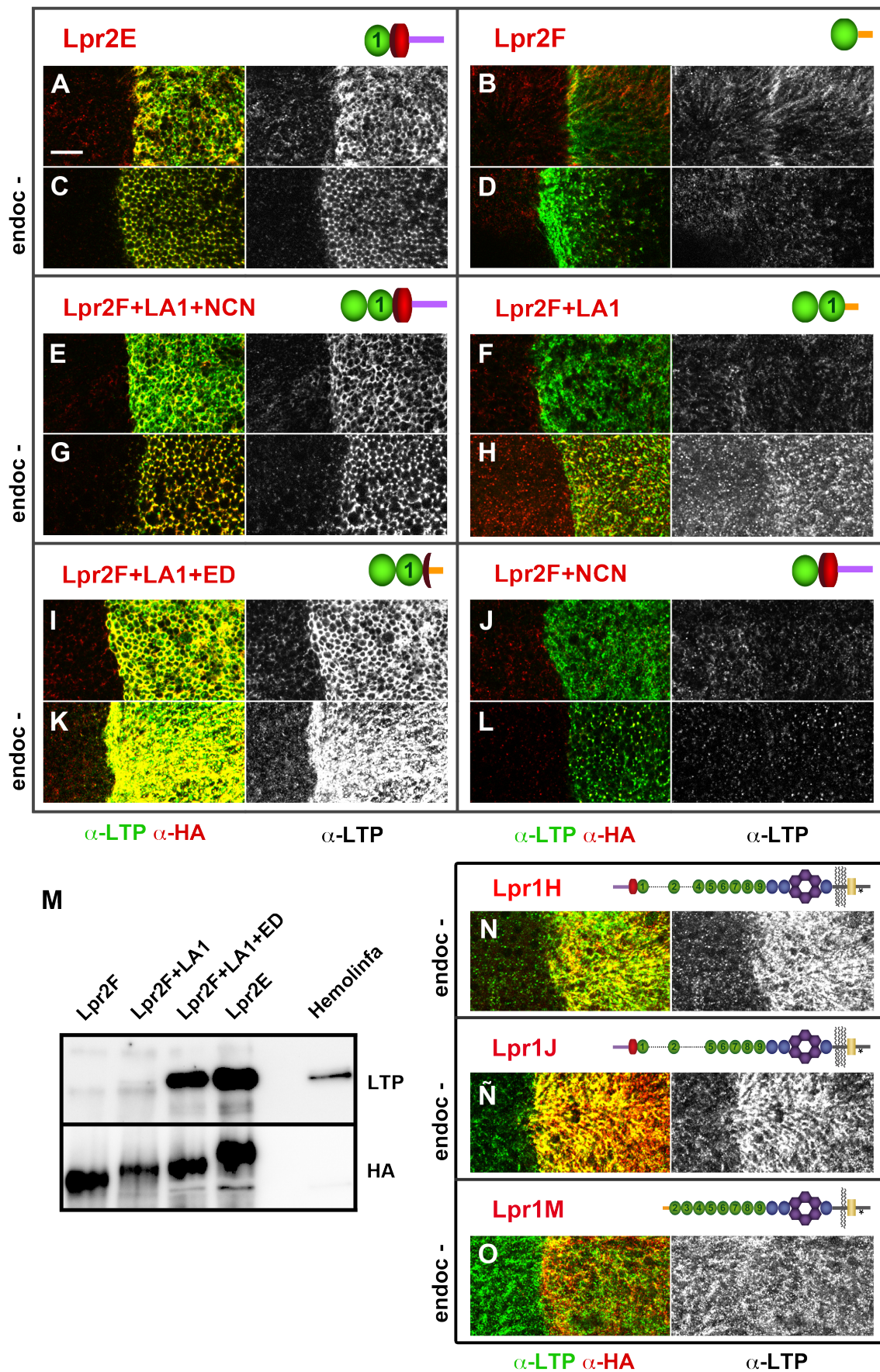


Figura 51. El dominio LA1 extendido encontrado en algunas isoformas de los receptores de lipoforinas se requiere para su fuerte unión al LTP. (A-L y N-O) Sección basal de discos imaginales de ala sobre-expresando las distintas isoformas y quimeras de los receptores de lipoforinas en el compartimento posterior (*hh-Gal4*) detectadas con α -HA en rojo. La distribución del LTP es mostrado en verde y también en un canal desglosado. Los paneles marcados como “endoc-“ muestran discos imaginales en los cuales la endocitosis fue bloqueada durante 3 horas previas a la disección por la inactivación del alelo termosensible de shibire (C,D,G,H,K,L,N,Ñ y O). Todas las imágenes están mostradas al mismo aumento. Barra de escala: 10 μ m. (M) Co-IP del LTP de algunas isoformas y quimeras de los receptores de lipoforinas. Lpr2F, Lpr2F+LA1, Lpr2F+LA1+ED y Lpr2E fueron expresadas y purificadas en células S2 de *Drosophila* e incubadas con hemolinfa diluida de larvas silvestres. Los receptores de lipoforinas y las quimeras fueron inmunoprecipitadas con α -HA y los eluidos detectados mediante *western blot* con α -LTP (panel superior) y α -HA (panel inferior). El último carril contiene hemolinfa.

detección. Concordando con los resultados descritos anteriormente, todas las quimeras que contienen los dominios LA1+ED, acumulan LTP en la región basolateral (Figura 51C, G y K), mientras que después de expresar Lpr2F o la quimera que carece de LA1 (Lpr2F+NCN) no se observa dicha acumulación (Figura 51D y L). Sorprendentemente, vimos que la quimera Lpr2F+LA1 era capaz de inducir una cierta acumulación de LTP, que era indetectable en condiciones normales (Comparar Figura 51F y H). Con lo observado en estos experimentos, podemos concluir que el dominio LA1 confiere cierta capacidad de unión al LTP, y que la adición de los 16 aminoácidos precedentes (ED) incrementa considerablemente esta interacción.

Corroboramos los resultados mostrados *in vivo* mediante ensayos *in vitro* de co-inmunoprecipitación entre los receptores de lipoforinas y el LTP. Los receptores de lipoforinas y sus quimeras fueron purificados de células S2 transfectadas con los respectivos plásmidos de expresión mediante una matriz magnética conjugada a proteína G y a α -HA. Esta matriz cargada ya con las distintas isoformas o sus quimeras fue incubada con hemolinfa diluida procedente de hemolinfa de larvas silvestres, que contiene LTP. Después de los lavados, la posible presencia de LTP unido a la matriz fue examinada mediante *western blot*. En la Figura 51M se muestra como Lpr2F no interacciona con el LTP. En cambio, al añadir el dominio LA1 se aprecia como existe cierta interacción. Asimismo, cuando extendemos esta región con los 16 aminoácidos precedentes (ED), observamos como aumenta sustancialmente la afinidad con el LTP a niveles similares a los de la isoforma Lpr2E. Por lo tanto, el ED ejerce un efecto sinérgico junto con el dominio LA1, aumentando la afinidad de los receptores de lipoforinas por el LTP.

El dominio LA1 extendido también está presente en algunas isoformas de *lpr1*. Por tanto, nos preguntamos si éstas también tendrían afinidad por el LTP. Para ello, sobre-expresamos varias isoformas de Lpr1 en discos imaginales de ala y examinamos su capacidad de inducir la acumulación de LTP. En estos experimentos inhibimos la endocitosis para aumentar su sensibilidad. Cuando sobre-expresamos las isoformas Lpr1H o Lpr1J, que presentan el dominio LA1, pudimos observar acumulación de LTP en la región basolateral de las células (Figura 51N y Ñ). Por el contrario, esto no ocurre con Lpr1M, la cual carece de este dominio (Figura 51O). Todos estos datos demuestran que sólo las isoformas que contienen el dominio LA1 extendido (LA1+ED) son capaces de interaccionar con el LTP eficientemente. Como el dominio LA1 se ha demostrado que es fundamental para la adquisición de lípidos, nuestros datos sugieren que la unión del LTP a los receptores de lipoforinas está relacionado con este proceso.

Comparación del dominio LA1 entre especies

Al percatarnos de que el dominio LA1 era crítico tanto para la unión con el LTP como para la adquisición de lípidos, decidimos llevar a cabo un estudio de su secuencia con el propósito de encontrar características específicas que lo diferenciaron del resto de dominios LA y que pudieran aportarle la particularidad de interaccionar con el LTP. Para ello nos ayudamos de la comparación filogenética de las secuencias de los receptores de lipoforinas en distintas especies.

En primer lugar, obtuvimos las secuencias de receptores de lipoforinas en diferentes especies. Extrajimos las secuencias de los distintos dominios LA, que identificamos por contener 6 cisteínas características que establecen tres puentes disulfuro, y medir entorno a 30 aminoácidos. Un alineamiento múltiple de todos los dominios LA (<http://www.genome.jp/tools/clustalw>) produjo un árbol filogenético en el que los dominios LA1 se agrupan según su identidad independientemente de la especie de la que proceda (Figura 52A). Ello es compatible con que los dominios LA1 contengan secuencias que no están presentes en los otros tipos de dominio LA. Al centrarnos en el LA1, observamos como dentro del *cluster*, se agrupan a su vez dependiendo del gen al que pertenezcan *lpr1* o *lpr2* (Figura 52B). Para identificar aquellos residuos conservados característicos de LA1, que no están presentes en los LA2-9, comparamos el alineamiento de los LA1 con el de todos los dominios LA de Lpr2E. Varios aminoácidos están conservados en todos los LA, como ya había sido descrito en Tufail and Takeda, 2008 (CDxxxDCxDGSDE). Sin embargo, observamos varios aminoácidos conservados en los LA1 que no están presentes en LA2-9, lo que sugiere que podrían ser relevantes para la interacción con el LTP (Figura 52C, arriba). En particular nos llaman la atención los aminoácidos cargados tanto negativa (D: Aspártico, E: Glutámico) como positivamente (K: Lisina) en el extremo amino de la secuencia, y un amino ácido de carácter hidrofóbico en la región central (I: Isoleucina), marcados en rojo en la Figura 28C, abajo. Por tanto, un posible sitio de unión entre el receptor y el LTP podría situarse en la región N-terminal del dominio LA1 (D/EEK), siendo la región más cercana a los 16 aminoácidos que constituyen el dominio extendido (ED).

e) La interacción de la isoforma Lpr2E con su ligando LTP se requiere para la estabilización de la lipoforina

Hemos comprobado que el dominio LA1 extendido (LA1+ED) presente en algunas isoformas de los receptores de lipoforinas es esencial para la acumulación extracelular de los ligandos lipoforina y LTP en la región basolateral de las células del epitelio. La acumulación de ambos correlaciona con la toma de lípidos por las células. Por un lado, tienen lugar cuando sobre-expresamos la isoforma Lpr2E, que media la toma de lípidos y no con Lpr2F, que no la media (Parra-Peralbo and Culi, 2011) y por otro, al eliminar el LTP o la lipoforina circulante mediante su silenciamiento por ARNi, tejidos como los ovarios o discos imaginales de ala ven reducida su capacidad de adquirir lípidos (Palm *et al.*, 2012 y Figura 50). Por esta razón nos preguntamos si la acumulación del LTP y la estabilización extracelular de la lipoforina son procesos relacionados o independientes. Para averiguarlo, disminuimos la cantidad de LTP en la hemolinfa y analizamos la estabilización de la lipoforina en discos imaginales de ala. Expresamos simultáneamente un ARN interferente contra el gen *apoLTP* (*UAS-apoLTP-i*) y el receptor Lpr2E (*UAS-lpr2E*) tanto en el cuerpo graso a través de la línea activadora *Cg-Gal4* como en la región posterior del disco imaginal de ala mediante la línea activadora *hh-Gal4*. Como la expresión continuada de *UAS-apoLTP-i* en el cuerpo graso es letal, limitamos la expresión de ambos transgenes temporalmente usando el sistema Gal80^{ts}. Vimos que la expresión de estos

transgenes durante dos días en el periodo larvario disminuía la cantidad de LTP circulante hasta niveles indetectables por *western blot*. Por el contrario, los niveles de lipoforina no se vieron afectados como se muestra en la Figura 53C. Como el gen *apoLTP* no se expresa en el disco de ala, la sobre-expresión de *UAS-apoLTP-i* en el mismo no esperamos que tenga ningún efecto. Como se ha descrito previamente, la expresión de Lpr2E en discos de ala produce la estabilización extracelular de la lipoforina en las membranas basolaterales (Figura 53A-A'). Esta acumulación se ve drásticamente disminuida al reducir la cantidad de LTP circulante (Figura 53B-B'). Estos resultados demuestran que la estabilización extracelular de la lipoforina requiere del reclutamiento previo o simultáneo del LTP mediante los receptores de lipoforinas.

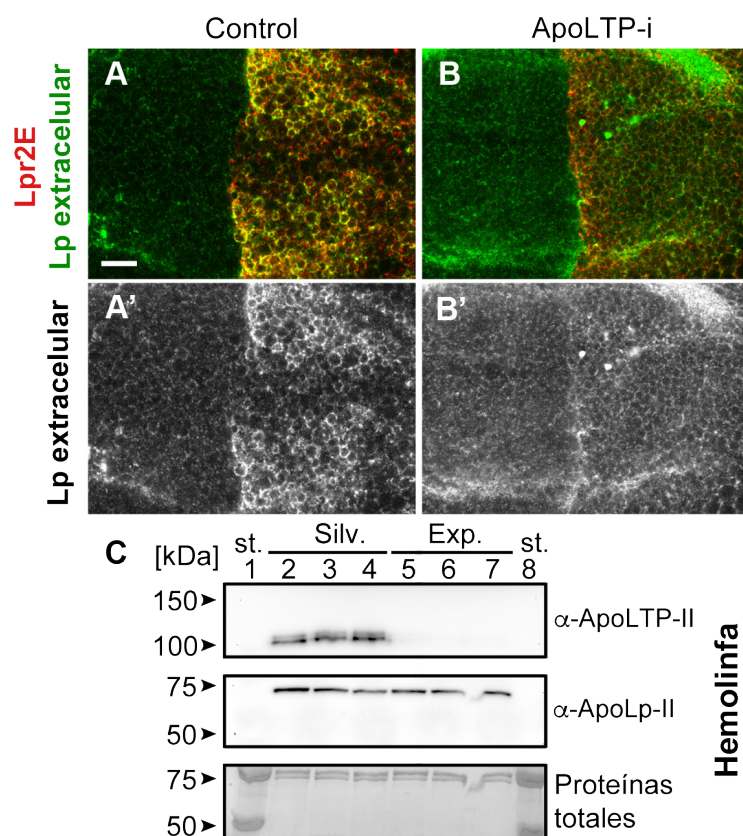


Figura 53. La estabilización extracelular de lipoforina por parte de Lpr2E requiere del LTP. (A y B) Discos imaginales de ala expresando *UAS-lpr2E-HA* en el compartimento posterior (*hh-Gal4*). Lpr2E-HA se muestra en rojo, mientras que la lipoforina extracelular en verde y también en canales separados (A' y B'). (A) Disco control (B) *apoLTP* fue silenciado por la expresión de *UAS-apoLTP-i* en el cuerpo graso (*Cg-Gal4*) durante 2 días previos a la disección. El uso del sistema Gal80^{ts} fue requerido para el control temporal. Se observó una gran reducción de lipoforina extracelular. El genotipo completo de (B) es *Cg-Gal4, tub-Gal80^{ts}/UAS-lpr2E-HA; hh-Gal4/UAS-apoLTP-i*. Barra de escala: 10 μ m. (C) *Western blot* de muestras de hemolinfa procedente de larvas silvestres (**Silv.**, líneas 2-4) y larvas experimento (**Exp.**, líneas 5-7) descritas en (B). El LTP y la lipoforina fueron detectadas usando los anticuerpos indicados. Tres réplicas biológicas fueron analizadas para cada genotipo. Las proteínas totales fueron teñidas con Coomassie coloidal siendo el control de carga. Los marcadores de peso molecular fueron cargados en las líneas 1 y 8. Los niveles de LTP circulante son indetectables en los animales experimentales mientras que los niveles de lipoforina son equivalentes al control.

Un efecto parecido también se observó en el cuerpo graso. Al expresar exclusivamente el receptor Lpr2E en este tejido se apreció un incremento en la acumulación tanto del LTP como de la lipoforina en la superficie celular (Figura 54 Comparar C-C' y D-D' con A y B). Por el contrario, cuando expresamos Lpr2E y a su vez silenciamos la expresión de *apoLTP* con el uso de un ARN interferente (*UAS-apoLTP-i*) en el cuerpo graso, la cantidad de lipoforina en la superficie de los adipocitos disminuyó fuertemente (Figura 54 Comparar F-F' con D-D'), y como era esperable, el LTP fue indetectable (Figura 54E-E'). Por tanto, vemos que en ambos tejidos, los discos imaginales y el cuerpo graso, el LTP es indispensable para la asociación de la lipoforina con Lpr2E.

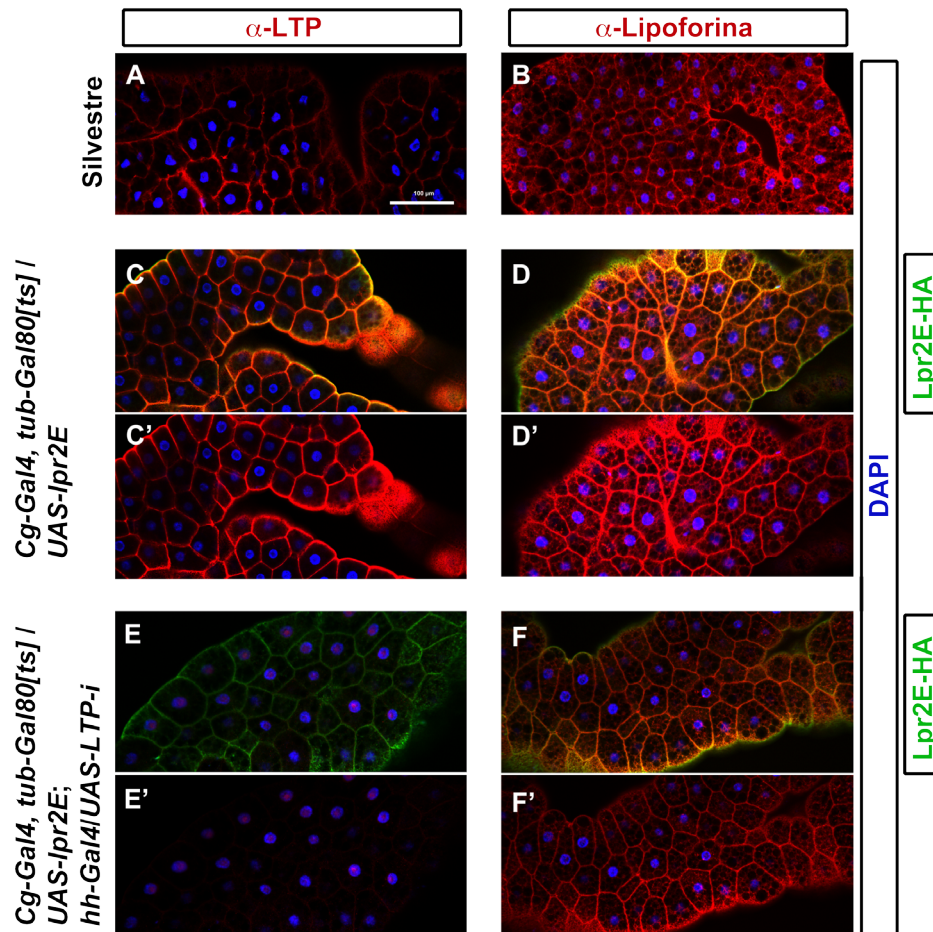


Figura 54. El LTP también es necesario para la estabilización de la lipoforina en las células del cuerpo graso. Las larvas fueron crecidas a 18°C y transferidas a 29°C durante los 2 días previos a la disección para activar los transgenes UAS. La distribución del LTP y la lipoforina se muestran en rojo, los núcleos (DAPI) en azul y la sobre-expresión de Lpr2E-HA en verde. (A) El LTP se acumula en las membranas celulares del cuerpo graso silvestre. Esta acumulación es fuertemente incrementada al sobre-expresar Lpr2E (C) e indetectable cuando se co-expresa con ApoLTP-i (E). (B) La lipoforina puede ser detectada tanto en las membranas celulares como en el citoplasma de las células del cuerpo graso silvestre. (D) La expresión de Lpr2E incrementa la cantidad de lipoforina acumulada en las membranas, sin embargo, (F) cuando se co-expresa con ApoLTP-i la lipoforina se reduce a niveles similares al silvestre, indicando que el incremento de la acumulación de lipoforina inducida por Lpr2E requiere LTP. Barra de escala: 100 μ m.

Los datos que acabamos de presentar sugieren que Lpr2E recluta al LTP y a la lipoforina a la membrana plasmática formando un complejo trimérico cuya estabilidad requiere al menos del LTP, ya que en ausencia de LTP la lipoforina no se une a lpr2E o lo hace con muy baja afinidad. El requerimiento de la lipoforina para la formación del complejo Lpr2E-LTP no se ha podido analizar directamente ya que la falta de lipoforina produce letalidad. Sin embargo, en la Figura 49A mostramos que el LTP permanece unido a Lpr2E en ausencia de lipoforina, indicando que al menos la lipoforina no se requiere para la estabilidad de la unión lpr2E-LTP *in vitro*. Teniendo esto en cuenta, quisimos analizar la estabilidad del complejo Lpr2E-LTP-lipoforina a lo largo del tiempo *in vivo*. Para ello expresamos el receptor Lpr2E en la región posterior de discos imaginales de ala y previo a la fijación del tejido, realizamos lavados en PBS a 4°C durante periodos crecientes de tiempo (30 y 60 minutos). Durante el lavado, el LTP y/o la lipoforina podrían disociarse del complejo, estando la endocitosis del complejo bloqueada por la baja temperatura. De este modo, pudimos apreciar como la lipoforina inicialmente estabilizada por Lpr2E se va dissociando a lo largo del tiempo (Figura 55A-C), mientras que el LTP se mantiene unido al receptor (Figura 55D-E), indicando que el complejo trimérico formado no es estable. Una posibilidad es que el complejo trimérico Lpr2E-LTP-lipoforina represente un intermediario funcional que sólo es estable durante el tránsito de los lípidos desde la lipoforina al LTP.

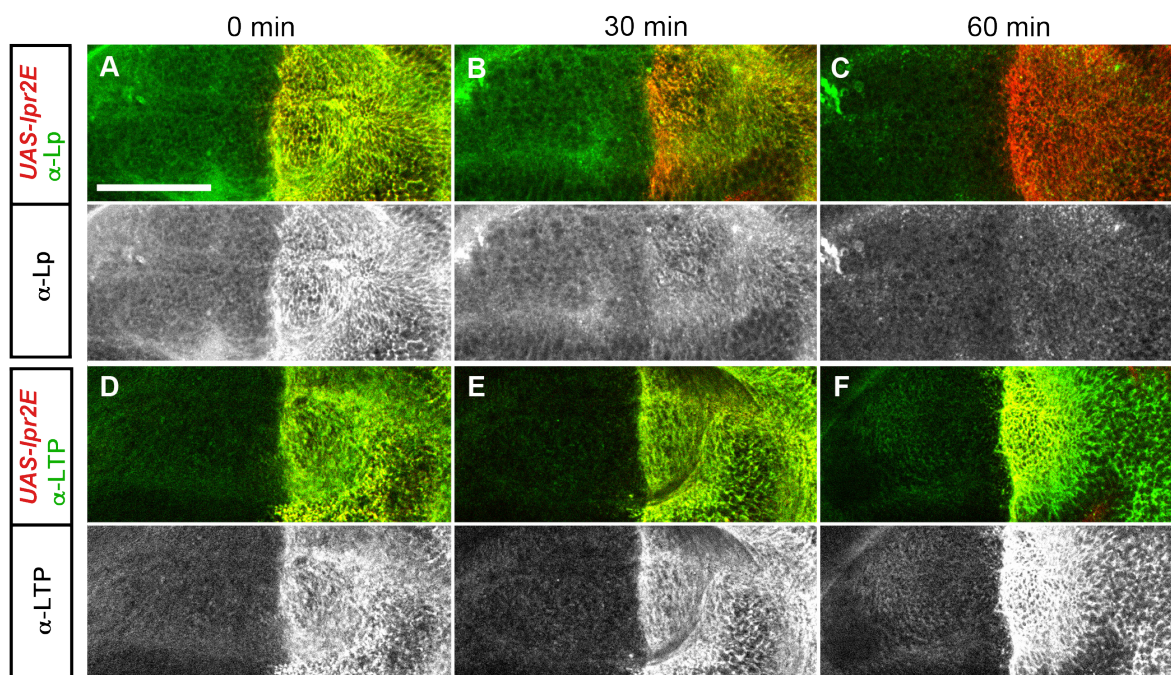
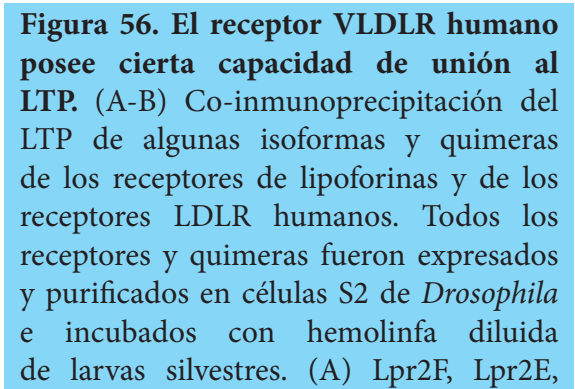


Figura 55. La asociación de la lipoforina con las células mediada por Lpr2E es transitoria. (A-F) Secciones basales de discos imaginales de ala sobre-expresando *UAS-lpr2E-HA* (α -HA en rojo) en el compartimento posterior. La endocitosis fue inhibida durante 3 horas y los discos fueron fijados inmediatamente (A y D) o lavados durante 30 minutos (B y E) o 60 minutos (C y F) en medio de cultivo celular a 4°C. La distribución de la lipoforina (A-C) y del LTP (D-F) se muestra en verde y también en canales separados. Barra de escala: 50 μ m.

f) Conservación de la función de los receptores LDLR

Hemos descrito como el reclutamiento del LTP en las membranas basolaterales de los discos imaginales de ala por parte de la isoforma Lpr2E gracias al dominio LA1 extendido (LA1+ED)

Lpr2F+LA1+ED, Lpr2F+LA1+NCN, *h*LDLR+LA1+NCN, *h*LDLR y (B) *h*VLDLRΔLA1, *h*VLDLR, *h*LDLR y Lpr2E fueron inmunoprecipitadas con α-HA y los eluidos detectados mediante *western blot* con α-LTP (panel superior) y α-HA (panel inferior izquierdo). El extracto de células S2 (S2) se usó como control negativo en (A). El último carril contiene hemolinfa en (B). Los extractos iniciales fueron analizados mediante α-HA (panel inferior derecho). (C-C'') Rescate de toma de lípidos en discos imaginales de ala doble mutantes para los receptores de lipoforinas en los que se ha sobre-expresado el receptor *h*VLDLR en el compartimento posterior (indicado con flecha). Los lípidos neutros son marcados con Nile red en amarillo y los núcleos con DAPI en azul. Barra de escala: 10 μm.



Lpr2F+LA1+ED, Lpr2F+LA1+NCN, *h*LDLR+LA1+NCN, *h*LDLR y (B) *h*VLDLRΔLA1, *h*VLDLR, *h*LDLR y Lpr2E fueron inmunoprecipitadas con α-HA y los eluídos detectados mediante *western blot* con α-LTP (panel superior) y α-HA (panel inferior izquierdo). El extracto de células S2 (S2) se usó como control negativo en (A). El último carril contiene hemolinfa en (B). Los extractos iniciales fueron analizados mediante α-HA (panel inferior derecho). (C-C'') Rescate de toma de lípidos en discos imaginiales de ala doble mutantes para los receptores de lipoforinas en los que se ha sobre-expresado el receptor *h*VLDLR en el compartimento posterior (indicado con flecha). Los lípidos neutros son marcados con Nile red en amarillo y los núcleos con DAPI en azul. Barra de escala: 10 μm.

RESULTADOS

Desafortunadamente, en la Figura 56A se observa como el receptor artificial no interacciona con el LTP, mientras que los controles (Lpr2E y las quimeras Lpr2F+LA1+ED y Lpr2F+LA1+NCN) si lo hacen. Por lo tanto, ni el receptor humano LDLR ni la quimera incluyendo el extremo N-terminal de Lpr2E: LDLR+LA1+NCN son capaces de interaccionar con el LTP.

Durante la realización de estos experimentos, examinamos también la interacción del VLDLR humano con el LTP de *Drosophila* mediante co-inmunoprecipitación. El VLDLR humano contiene 8 dominios LA, por lo que en este aspecto es más parecido a Lpr2E que el LDLR humano, que sólo contiene 7. Sorprendentemente, tal como se muestra en la Figura 56B, el receptor *hVLDLR* se une levemente al LTP. Ello nos impulsó a caracterizar un poco mejor esta interacción. Como el dominio mínimo responsable de la unión de los receptores de lipoforinas de *Drosophila* con el LTP es LA1, deletamos dicho dominio en el VLDLR humano, generando *UAS-hvldlr Δ LA1-HA*. En la Figura 56B, se puede apreciar como el LTP no interacciona con este receptor, mientras que sí interacciona de manera muy robusta con Lpr2E y levemente con el *hVLDLR*. Estos resultados sugieren que el VLDLR humano, al igual que Lpr2E, es capaz de interaccionar aunque débilmente con el LTP. Asimismo, de los 8 dominios LA que posee, al eliminar el primero de ellos (LA1), se pierde la afinidad por el ligando. Por el contrario, el receptor *hLDLR*, de tan sólo 7 dominios LA, no tiene la capacidad de unir el LTP.

El hecho de que el receptor VLDLR humano fuese capaz de interaccionar levemente con el LTP, nos sugería que además, podría mediar la toma de lípidos celular. Por este motivo, decidimos examinar el rescate de lípidos en discos de ala mutantes para los receptores de lipoforinas, en los que se sobre-expresó el receptor VLDLR humano. Tal como se muestra en la Figura 56C-C'' (flecha), el receptor VLDLR no rescata la toma de lípidos a pesar de interaccionar con el LTP. Además, puede apreciarse una morfología anómala del tejido en la región posterior debido probablemente a la sobre-expresión de la proteína.

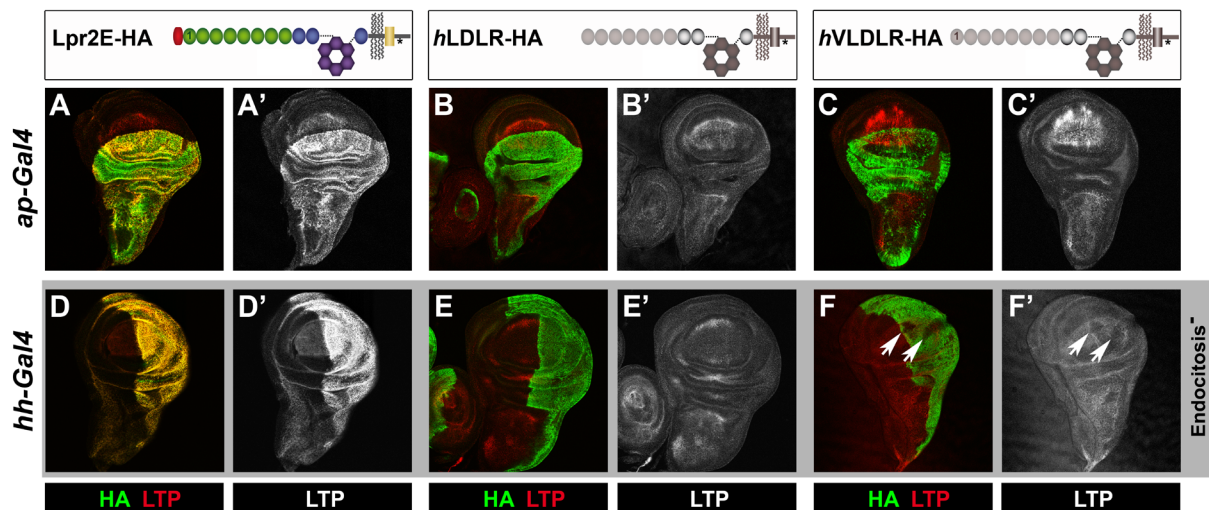


Figura 57. Análisis *in vivo* de la capacidad del receptor VLDLR humano de reclutar LTP en discos imaginales de ala. Secciones basales de discos imaginales de ala en los que se ha sobre-expresado Lpr2E-HA, *hLDLR*-HA y *hVLDLR*-HA en el compartimento dorsal (A-C) y en el compartimento posterior (D-F). Además, la endocitosis fue bloqueada durante 3 horas previas a la disección por la inactivación del alelo termosensible de shibire (D-F). Los receptores fueron detectados con α -HA en verde y el LTP en rojo. No se detectó acumulación de LTP con ningún receptor humano en comparación con Lpr2E (Comparar A' y D' con B', C', E' y F'). Las flechas señalan la pérdida de la integridad del epitelio (F-F'). Todos los paneles se muestran al mismo aumento. Barra de escala: 10 μ m.

Dado que los resultados del rescate fueron negativos, decidimos contrastar los resultados bioquímicos analizando *in vivo* la capacidad de unión del LTP con los receptores humanos. Para ello, expresamos los transgenes *UAS-lpr2E-HA*, *UAS-hldlr-HA* y *UAS-hvldlr-HA* en la zona dorsal de los discos imaginales de ala usando la línea activadora *ap-Gal4*. Ninguno de los receptores humanos acumularon LTP en la zona de sobre-expresión a diferencia del receptor de *Drosophila*, Lpr2E (Figura 57 Comparar A con B y C). Al igual que en ensayos anteriores, aumentamos la sensibilidad del experimento inhibiendo la endocitosis usando el alelo termosensible de *shibire* (*shi^{ts}*), y expresamos los receptores en la zona posterior del disco de ala con la línea activadora *hh-Gal4*. Tampoco en este caso se detectó acumulación del LTP (Figura 57 Comparar D con E y F).

Nuestros datos *in vitro* indicaban que el VLDLR humano tenía cierta capacidad de interaccionar con el LTP, que no podemos detectar *in vivo*. Sin embargo, observamos que su expresión en el disco imaginal no era homogénea, sugiriendo cierta toxicidad celular (Figura 57F-F', flechas). Ésta resultó más obvia después de su sobre-expresión en una zona mayor del disco con la línea activadora *nub-Gal4* (Figura 58A-A', flecha). También observamos que el hVLDLR inducía una morfología irregular en células S2 transfectadas (Figura 58 Comparar E-E' con B-D). Ello nos permite concluir que la expresión del VLDLR humano en *Drosophila* es tóxica y por tanto no es posible llegar a ninguna conclusión respecto a su posible actividad en la toma de lípidos.

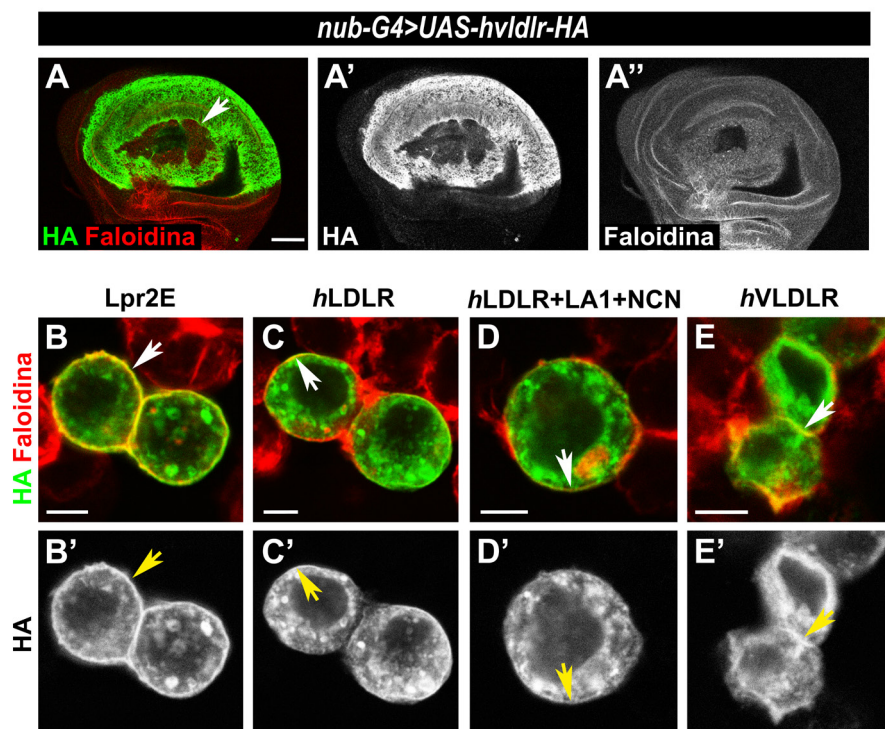


Figura 58. La sobre-expresión continuada de hVLDLR produce alteraciones morfológicas tanto en discos imaginales de ala como en células S2 de *Drosophila*. (A) Expresión de hVLDLR en el primordio del disco imaginal de ala durante 48 horas usando el sistema Gal80^{ts}. La flecha señala un hueco creado en la membrana basal (B-E) Expresión de los transgenes *UAS-lpr2E-HA*, *UAS-hldlr-HA*, *UAS-hldlr+LA1+NCN-HA* y *UAS-hvldlr-HA* en células S2 transfectadas. Los receptores fueron detectados con α -HA en verde y faloidina en rojo para marcar los contornos celulares. Las flechas indican las zonas donde el receptor se localiza en la membrana. B-E se muestran al mismo aumento. Barra de escala: 100 μ m.

2.3. Posible interacción de los receptores de lipoforinas con un ligando no relacionado con el metabolismo lipídico: la Peroxidasina (Pxn).

La función principal de los dos genes de los receptores de lipoforinas (*lpr1* y *lpr2*) descrita en esta tesis está relacionada con el metabolismo lipídico en *Drosophila* (Parra-Peralbo and Culi, 2011; Rodríguez-Vázquez, *et al.*, 2015). No obstante, se ha comprobado que los receptores de lipoforinas participan en la regulación de otros procesos como por ejemplo, la morfología de las neuronas por parte del gen *lpr2* (Sepp *et al.*, 2008) o la regulación de la respuesta inmune frente a hongos y bacterias Gram negativas por parte del gen *lpr1* (Soukup *et al.*, 2009). Por lo tanto, no es de extrañar que en el proceso de búsqueda de nuevos interactores realizado previamente en el laboratorio se encontraran candidatos cuyas funciones no están aparentemente relacionadas con la toma de lípidos celular. Entre ellos, se aisló una proteína que interactuaba con la isoforma Lpr2E y no así con la Lpr2F (Figura 59A, banda específica indicada con 1). Ésta fue identificada como Peroxidasina mediante espectrometría de masas.

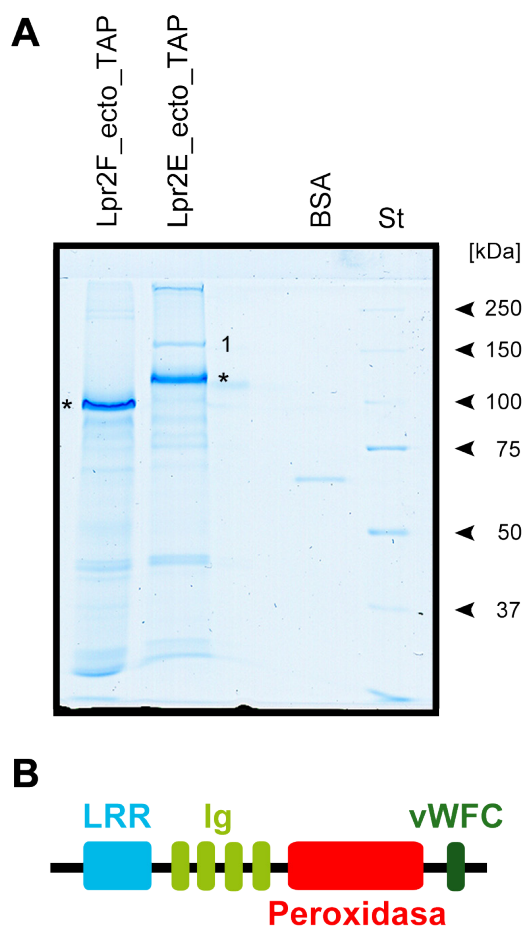


Figura 59. La Peroxidasina como posible nuevo ligando de los receptores de lipoforinas. (A) Gel SDS-PAGE teñido con Coomassie mostrando el pull-down de extractos de larvas totales expresando los receptores secretables *UAS-lpr2E_ecto_TAP* y *UAS-lpr2F_ecto_TAP* en el cuerpo graso usando la línea activadora *FB-Gal4*. La purificación fue llevada a cabo en dos pasos, usando las matrices de IgGs-Sefarosa y Calmodulina-Sefarosa. Las bandas fueron identificadas mediante espectrometría de masas: 1: Peroxidasina, *: Receptores expresando la etiqueta TAP. St: estándar de peso molecular. (B) Representación modular de la proteína Peroxidasina. Desde el extremo N-terminal se localizan las repeticiones ricas en leucina (LRR del inglés, *Leucine-Rich Repeats*), cuatro dominios de inmunoglobulina (Ig), el dominio enzimático con actividad peroxidasa y el Factor de tipo C Von Willebrand (vWFC, del inglés, *Von Willebrand Factor type C*). Imagen modificada de Ero-Tolliver *et al.*, 2015.

La peroxidasina (Pxn) es una proteína secretada encontrada por primera vez en células en cultivo derivadas de hemocitos de *Drosophila* (Nelson *et al.*, 1994). Su función principal parece estar relacionada con la consolidación de la matriz extracelular mediante la formación de enlaces covalentes entre moléculas de colágeno gracias a su actividad peroxidasa (Bhave *et al.*, 2015). La proteína está compuesta por varias regiones (Figura 59B). Desde el extremo N-terminal nos encontramos con una zona que presenta repeticiones ricas en leucina (LRR, del inglés

Leucine-Rich Repeats), seguidas de 4 dominios de inmunoglobulinas (Ig). A continuación, se sitúa el dominio enzimático con actividad peroxidasa, que presenta homología con el dominio de la enzima humana mieloperoxidasa (MPO) y finalmente, en el extremo C-terminal se localiza el Factor de tipo C Von Willebrand (vWFC, del inglés, *Von Willebrand Factor type C*).

En primer lugar, analizamos la interacción física entre los receptores de lipoforinas y la Peroxidasina realizando un ensayo de co-inmunoprecipitación. Para expresar la Peroxidasina en cultivos celulares generamos un transgen basado en el vector de expresión constitutiva pAC5.1 en el que clonamos un ADNc de Peroxidasina y al que le añadimos 6 copias del epítipo Myc en el extremo C-terminal, facilitando de esta manera su detección (ver en más detalle en el apartado 5.1 de Métodos). El transgen *peroxidase-Myc* fue co-transfectado junto con la isoforma Lpr2E-HA o Lpr2F-HA en células S2 de *Drosophila*. Utilizando los extractos de células se realizaron las Co-IPs en las dos direcciones posibles: inmunoprecipitando los receptores de lipoforinas (Figura 60A y C) o inmunoprecipitando la Peroxidasina (Figura 60B y C) mediante esferas magnéticas *dynabeads*-proteína G conjugadas con α -HA o con α -Myc, respectivamente. Como control negativo se utilizó extracto de células expresando Peroxidasina o la isoforma Lpr2F. La posible presencia de Peroxidasina o del receptor unido a la matriz fue examinada mediante *western blot*. Detectamos co-inmunoprecipitación de Lpr2E y Lpr2F al inmunoprecipitar la Peroxidasina, siendo la cantidad parecida para ambas isoformas (Figura 60B). Por el contrario, al inmunoprecipitar los receptores de lipoforinas no detectamos co-inmunoprecipitación de la Peroxidasina (Figura 60A). Estos resultados indican que ambas isoformas tienen aparentemente la misma capacidad de interaccionar con la Peroxidasina.

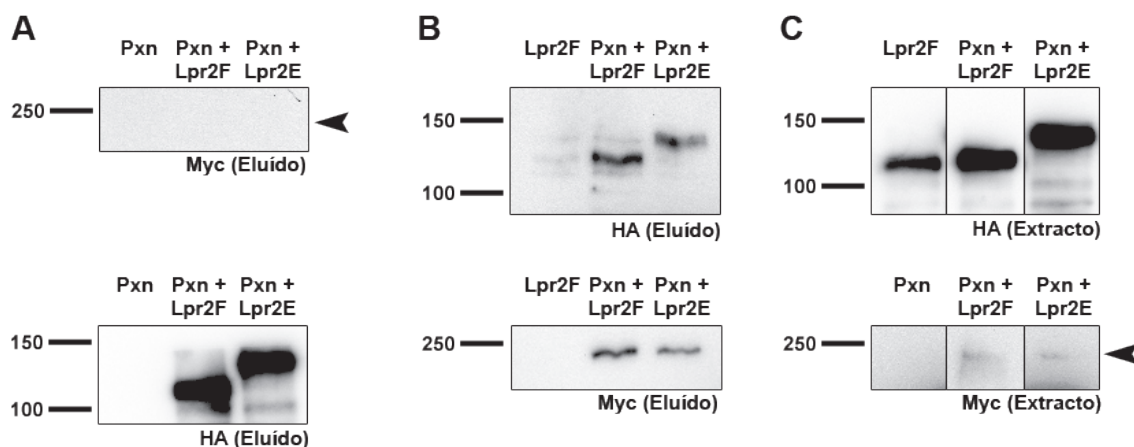


Figura 60. Análisis físico de la interacción entre los receptores de lipoforinas y la Peroxidasina. (A) Co-inmunoprecipitación de la Peroxidasina a partir de extractos de células S2 en los que se han co-expresado *peroxidase-Myc* con *UAS-lpr2E-HA* o *UAS-lpr2F-HA*. Los receptores fueron inmunopurificados con α -HA y los eluidos analizados mediante *western blot* con α -Myc (panel superior) y α -HA (panel inferior). El extracto de Peroxidasina (Pxn) se usó como control negativo. La flecha señala la región correspondiente al peso molecular de la Peroxidasina (170 kDa). (B) Co-inmunoprecipitación de los receptores a partir de extractos de células S2 en los que se han co-expresado *peroxidase-Myc* con *UAS-lpr2E-HA* o *UAS-lpr2F-HA*. La Peroxidasina fue inmunopurificado con α -Myc y los eluidos detectados mediante *western blot* con α -HA (panel superior) y α -Myc (panel inferior). El extracto de Lpr2F se usó como control negativo. (C) Los extractos iniciales fueron detectados con α -HA (panel superior) y α -Myc (panel inferior).

RESULTADOS

Con el propósito de contrastar estos datos bioquímicos con el análisis *in vivo*, obtuvimos de una colección pública una cepa de *Drosophila* en la que la proteína Peroxidasina se expresaba como una fusión a la proteína fluorescente YFP desde su localización cromosómica propia (*protein-TRAP: Pxn [CPTI003897]-YFP*). Ello nos permite estudiar *in vivo* la capacidad de unión entre los receptores de lipoforinas y la Peroxidasina. Cuando expresamos la isoforma Lpr2E-HA en el compartimento posterior de discos imaginales de ala, y examinamos la presencia de Peroxidasina mediante α -GFP (Figura 61A) o en combinación con α -HA (Figura 61B-B'), observamos como en ambos casos hay una leve acumulación de peroxidasina en la zona de sobre-expresión. Esta acumulación es también observable examinando directamente la autofluorescencia de la YFP, sin el uso de anticuerpos, si bien es más débil (Figura 61C). Todos estos resultados nos lleva a la conclusión de que los receptores de lipoforinas podrían tener cierta capacidad de unión a la peroxidasina. Lamentablemente no pudimos seguir con esta línea de investigación en el laboratorio para confirmar dicha interacción y la especificidad para las distintas isoformas de los receptores de lipoforinas.

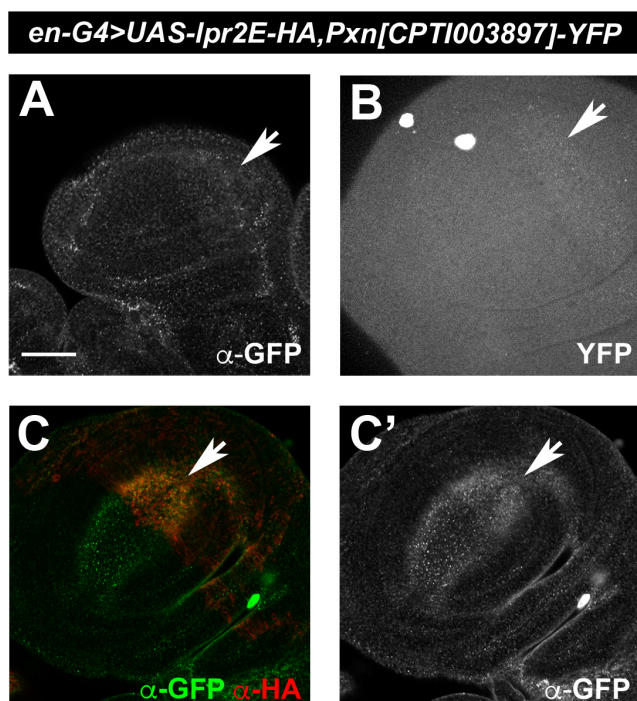
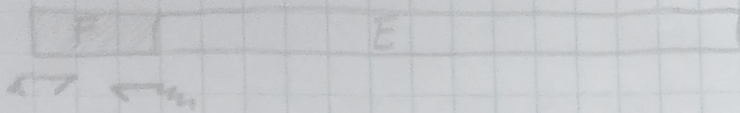


Figura 61. Estudio *in vivo* en discos imaginales de ala de la interacción entre los receptores de lipoforinas y la Peroxidasina. Expresión de la proteína endógena Pxn[CPTI003897]-YFP mediante el uso de una protein-TRAP junto con el transgen *UAS-lpr2E-HA* en el compartimento posterior de discos imaginales de ala. La peroxidasina se detectó con anti-GFP (A y B) o mediante la autofluorescencia YFP de Pxn[CPTI003897]-YFP (C). En (B) también se muestra LprE en rojo. Las flechas señalan la acumulación de la Peroxidasina. Todos los paneles se muestran al mismo aumento. Barra de escala: 50 μ m.

SPCF) 2E



- ①
- ②

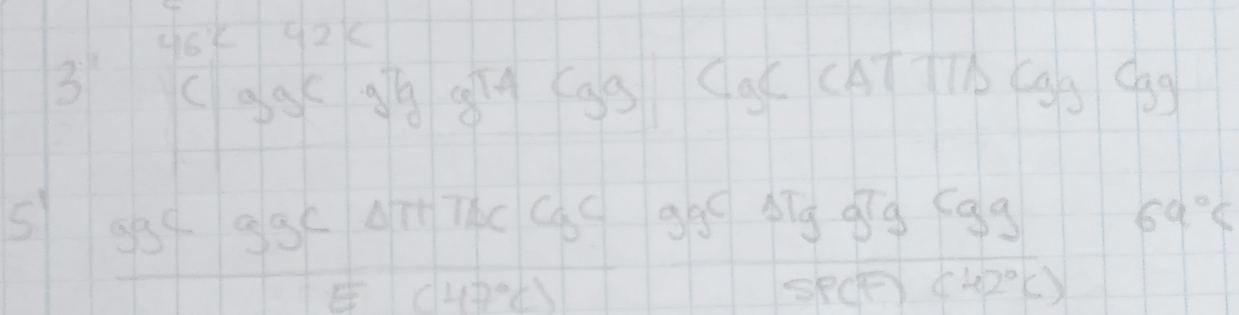
① Fragmento grande SP (SPCF)

DISCUSIÓN

✓ \rightarrow Lpr2UASLR 40°C 50°C

PEDIR (Sigma)

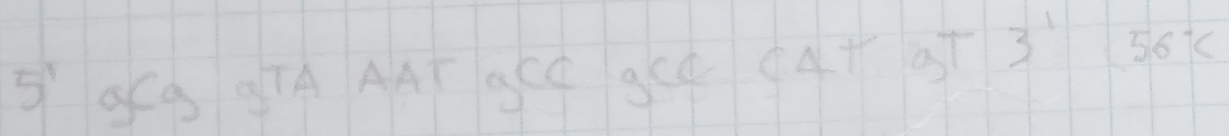
\rightarrow Lpr2E-SP-R // SPF-R



② Fragmento grande 2E \emptyset SP

PEDIR (Sigma)

\rightarrow Lpr2E-SP-F // SPF-F



✓ \rightarrow Lpr2FL-R 56°C 60°C +

HindIII

1. Los distintos péptidos señal presentes en las isoformas de los receptores de lipoforinas determinan sus niveles de expresión

En mamíferos, el receptor de LDL (LDLR) tiene un papel clave en la regulación del metabolismo del colesterol, promoviendo la endocitosis de las lipoproteínas LDL ricas en colesterol ya sea para el uso celular o para su eliminación principalmente en el hígado. El LDLR está conservado a lo largo de la evolución. En particular, el genoma de *Drosophila* contiene dos genes con alta homología al LDLR humano, el *receptor de lipoforinas 1* y el 2. De hecho, la función de estos genes en el metabolismo lipídico de *Drosophila* ha sido caracterizada con cierto detalle revelando que, de forma parecida al LDLR, se unen a lipoproteínas circulantes. Además, se ha visto que estos dos receptores, parcialmente redundantes, son esenciales para la adquisición celular de lípidos neutros en varios tejidos periféricos tales como los epitelios de los discos imaginales o los ovarios. Estudios de este tipo están permitiendo identificar paralelismos entre el metabolismo lipídico en los humanos con aspectos del mismo en *Drosophila* y por tanto, abriendo la posibilidad de utilizar el amplio abanico de técnicas genéticas y la versatilidad de este organismo modelo para estudios del metabolismo lipídico en general.

Un aspecto completamente desconocido de la biología de los receptores de lipoforinas *lpr1* y *lpr2* es el significado biológico de las múltiples isoformas que generan, al menos unas diez para cada gen (Figura 14). Se diferencian entre ellas por el distinto número e identidad de los dominios LA, sus péptidos señal y por la longitud del dominio de O-glicosilación. Estas características son compartidas por los receptores de lipoforinas de otros insectos como por ejemplo *Bombyx mori*, en el que se han caracterizado 4 isoformas con diferentes patrones de expresión. Destaca la isoforma Lpr4 cuya expresión se restringe exclusivamente al sistema nervioso, y diferenciándose del resto en los últimos 18 aminoácidos de la región citoplasmática (Gopalapillai *et al.*, 2006). En *Aedes aegypti*, se ha demostrado que las isoformas que se expresan en el cuerpo graso y en los ovarios son distintas, diferenciándose en el número de dominios de unión a ligando (LA), que es de 7 y 8 respectivamente, y en la longitud del péptido señal, que son de 34 y 84 aminoácidos respectivamente (Seo *et al.*, 2003). En *Drosophila*, se vio que las isoformas que contienen el dominio adicional LA1 median la toma de lípidos, mientras que las isoformas que no lo contienen, si bien se expresan en varios tejidos como el cerebro o el cuerpo graso, no tienen ninguna función detectable en el metabolismo de los lípidos neutros y su función permanece por tanto desconocida.

Por todo ello, en esta tesis analizamos en detalle las diferencias entre las distintas isoformas de los receptores de lipoforinas de *Drosophila*. Una de las características que nos llamó la atención fue la distinta distribución subcelular de las isoformas que median la toma de lípidos comparada con aquellas no implicadas en el metabolismo lipídico, al ser sobre-expresadas mediante transgenes. Así, mientras que Lpr2E se localiza homogéneamente en el citoplasma de las células, Lpr2F se acumula fundamentalmente en un dominio apical y otro basal, siendo casi indetectable en la zona intermedia (Figura 25). Esto podría ser importante para explicar sus distintas funciones. Por esta razón, emprendimos una serie de experimentos para caracterizar los dominios proteicos específicos de isoforma responsables de estas distintas localizaciones. La conclusión principal fue que el péptido señal, distinto en las isoformas que median la toma de lípidos respecto a las inactivas, era el principal determinante de las distintas distribuciones observadas (Figuras 30 y 31). Estos péptidos señal se diferencian principalmente en su longitud, siendo atípicamente

largos aquellos que pertenecen a las isoformas que median la toma de lípidos (como Lpr2E). Los péptidos señal fueron identificados mediante algoritmos bioinformáticos y no llegamos a caracterizarlos experimentalmente, aunque este tipo de predicciones es muy fiable (Hiss and Schneider, 2009).

Las distintas distribuciones subcelulares observadas nos hizo pensar que estas proteínas podrían acumularse en distintos compartimentos de la vía secretora o endocítica. Sin embargo, su análisis en discos imaginales de ala y en células S2 utilizando marcadores para distintos compartimentos subcelulares no mostró diferencias significativas (Figuras 27 y 28).

Nuestros experimentos mostraron que la principal propiedad del péptido señal atípico es que induce unas diez veces menos expresión que el péptido señal típico. Por tanto, la presencia de un tipo u otro de péptido señal define la eficiencia de traducción de estas proteínas (Figuras 38, 39 y 40). La baja eficiencia del péptido señal largo podría deberse a su larga región hidrofóbica (región **h**), ya que se ha visto que esta característica induce un cambio en su posición cuando está asociado al translocón que disminuye la probabilidad de ser procesado por la enzima Signal peptidase (SPase) co-traduccionalmente (Von Heijne, 1984). En la bibliografía podemos encontrar casos similares. Por ejemplo, la regulación negativa de la expresión de la proteína interleucina15 está asociada con el uso de un péptido señal atípicamente largo. La interleucina 15, una proteína implicada en el sistema inmunitario, posee 2 isoformas con péptidos señal de distinta longitud, uno típico de 21 aminoácidos y otro atípicamente largo de 48. El péptido señal largo permite que la tasa de secreción sea más baja. Se desconoce si es debido a una lenta liberación del translocón o por una interacción ineficiente con la enzima Signal peptidase (SPase) (Kurys *et al.*, 2000). Otro ejemplo es la generación de las formas citosólica y secretada del inhibidor del activador de plasminógeno 2 (PAI-2), descrito en Belin *et al.*, 1989. El péptido señal de esta proteína interacciona con la maquinaria de translocación con baja eficiencia de forma que únicamente una fracción de las cadenas nacientes sigue la ruta secretora y es secretada, el resto pasa a la fracción citoplasmática. Finalmente, en el caso de la interleucina 2, se generan dos péptidos señal diferentes por el uso de distintos codones de inicio. Estos péptidos señal contribuyen a definir si la interleucina 2 se transporta mediante la vía secretora o por el contrario se dirige al núcleo (Acland *et al.*, 1990).

Los distintos niveles de expresión mediados por los péptidos señal proximal (típico, con altos niveles de expresión) y distal (atípico, con bajos niveles) probablemente tienen un cierto efecto en la distribución subcelular de los receptores de lipoforinas. Sin embargo, en los experimentos iniciales que realizamos estas diferencias de expresión generaban, de manera artefactual, unos asombrosos cambios en la distribución subcelular de los receptores (Figura 25). El análisis detallado de este efecto reveló que los altos niveles de receptores de lipoproteínas que se podían obtener con los transgenes que llevaban el péptido señal típico inducían la activación de caspasas y la muerte celular por apoptosis (Figuras 36 y 37). En los experimentos iniciales, detectábamos los receptores de lipoforinas en experimentos inmunohistoquímicos gracias al epítipo HA que poseían los transgenes. Desafortunadamente, el epítipo HA contiene una diana de corte de las caspasas, de manera que las células que han iniciado la cascada apoptótica pierde su inmunorreactividad (Schembri *et al.*, 2007) y esta era la principal causa de las distintas distribuciones observadas. Si bien este efecto nos confundió inicialmente, estudios adicionales comparando la distribución de los receptores expresados a bajos niveles que no inducían apoptosis y detectándolos de manera independiente al epítipo HA, mostraron que Lpr2F seguía mostrando una cierta preferencia por acumularse en la región apical. Desconocemos la base

molecular de esta preferencia. Los datos obtenidos a lo largo de esta tesis, nos hace pensar que los receptores de lipoforinas al ser sintetizados se dirigen preferencialmente hacia la región apical (Figura 27). Una vez en la membrana plasmática apical, se podrían redistribuir hacia las membranas basolaterales (Figura 34). Esto concordaría con los resultados en los que hay una gran acumulación de la proteína en apical debido a la alta tasa de transcripción promovida por el péptido señal típico.

¿Porque las isoformas de los receptores de lipoforinas que median la toma de lípidos contienen un péptido señal poco eficiente? Una posibilidad sería que simplemente estas proteínas deban expresarse a bajos niveles o que altos niveles de expresión resultaran en toxicidad celular. De hecho, nuestros datos son consistentes con que la expresión artificial de *UAS-Lpr2E* a altos niveles induce cierta toxicidad celular (Figura 40). Sin embargo, esto sólo ocurre a niveles muy altos y alejados de las condiciones fisiológicas, por lo que probablemente no tiene relevancia funcional. Otra posibilidad más interesante es que la actividad, basalmente baja, de los péptidos señales atípicos de los receptores de lipoforinas pudiera estar regulada por los requerimientos lipídicos celulares, de manera que niveles bajos de lípidos celulares indujeran una mayor eficiencia del péptido señal, mayores niveles de receptores de lipoforinas y por tanto mayor adquisición de lípidos en la célula. Alternativamente, el péptido señal ya procesado podría ejercer funciones *post-targeting* relacionadas con la homeostasis lipídica. El hecho de que el péptido señal presente en las isoformas que median la toma de lípidos sea atípicamente largo concordaría con esta segunda posibilidad. De hecho, se han descrito en la literatura varios casos en los que un péptido señal atípico tiene funciones *post-targeting*. Por ejemplo, el péptido señal de la glicoproteína del virus linfocítico de la coriomeningitis de 58 aminoácidos, es procesado por la SPase y retenido en la membrana del retículo endoplasmático donde se une a la proteína naciente, siendo esencial para su maduración y la infectividad del virus (Schrempf *et al.*, 2007). Otro ejemplo es el precursor de la prolactina (prePro^{SP}: 86 aminoácidos), procesado por las enzimas SPase y SSPase. Esta última produce un péptido bioactivo (el fragmento N-terminal resultante) que se libera al citosol e interacciona con la proteína calmodulina de manera dependiente de Ca²⁺, regulando de esta manera la secreción de la prolactina (Martoglio *et al.*, 1997). Sin embargo, nuestros experimentos no relevaron que la disponibilidad lipídica celular afectara a la eficiencia del péptido señal atípico (Figura 42). Tal vez experimentos realizados en condiciones más controladas, por ejemplo en células S2 que expresen los receptores de lipoforinas y cultivadas en medio de cultivo delipidado o suplementado con ácido oleico, podrían ser más sensibles (Guo *et al.*, 2008). Otra posibilidad para esclarecer si la presencia del péptido señal atípico tiene alguna relevancia en la toma de lípidos más allá de los ensayos crudos que hemos podido realizar, consistiría en modificar directamente los genes *lpr1* y *lpr2* mediante edición del genoma, por ejemplo mediante la técnica CRISPR/Cas9, substituyendo el péptido señal atípico por el típico de las isoformas que no median la toma de lípidos. Este tipo de análisis también permitiría examinar la relevancia de la lisina de la región C-terminal (c), con carga positiva, presente en todas las especies de *Drosophila* y en la mosca del mediterráneo *Ceratitis capitata*, para comprobar si es responsable de la baja eficiencia del péptido señal. En todo caso, hemos demostrado claramente que el péptido señal atípico no es esencial para que los receptores de lipoforinas medien la toma de lípidos. Así, hemos ensayado varias quimeras que si bien contienen el péptido señal corto, poseen el dominio LA1. Estas quimeras median la toma de lípidos de manera similar a las que tienen el péptido señal atípico.

En general, la función de los péptidos señal está completamente codificada en su secuencia y en los dos aminoácidos adyacentes al sitio de corte. Sin embargo, en el caso de los péptidos

señal atípicos de los receptores de lipoforinas tenemos evidencias de que los aminoácidos entre el péptido señal y/o los 16 aminoácidos que forman parte del dominio extendido (ED), son también relevantes para su función. Así, la quimera SP(E)_Lpr2F, que no contiene esos aminoácidos, se expresa a menores niveles que Lpr2E. Esto se observa tanto en inmunotinciones donde apenas hay acumulación en apical o basal (Ver Figura 33 Comparar B con D), como en *western blot* (ver Figura 39A). El hecho de que tanto el péptido señal como el dominio NCN proceden del mismo exón (exón 2) (Figura 14), refuerza la hipótesis de que forman parte de una misma unidad funcional.

Desafortunadamente, no pudimos encontrar una función fisiológica para el péptido señal atípicamente largo característico de los receptores que median la toma de lípidos. Su conservación evolutiva dentro de los dípteros sugiere que tiene una función, al menos en estos organismos. Sin embargo, esta función no se extendería a mamíferos ya que al analizar los péptidos señales de varios miembros de la familia LDLR en mamíferos (Megalin, LRP1, LRP1b, MEGF7, LRP5, LRP6, VLDL, LDL y ApoER2), todos eran típicos (Ver anexo II). Tampoco encontramos secuencias homólogas al péptido señal al realizar un análisis mediante BLAST en ninguna otra proteína, lo que habría indicado que esa función podría haber sido transferida a otra proteína mediante evolución divergente.

2. La lipoforina se une débilmente a los receptores de lipoforinas

Los receptores de lipoforinas fueron descritos en varias especies de insectos por su propiedad de interactuar con la lipoforina. La evidencia más directa fue la observación de que la expresión heteróloga del receptor en células de mamífero en cultivo inducía la endocitosis de las lipoforinas añadidas al medio (Dantuma *et al.*, 1997). En otros estudios, se vio mediante ensayos de *far-western* realizados a partir de extractos de tejido que la lipoforina purificada, a altas concentraciones, se unía a una de las proteínas transferidas a la membrana que mostraba un tamaño consistente con los receptores de lipoforinas, sugiriendo que se unía a estos (Tsuchida and Wells, 1990; Lee *et al.*, 2003a,b). En esta tesis hemos analizado exhaustivamente y de forma más directa la interacción de los receptores de lipoforina con la lipoforina mediante ensayos de co-inmunoprecipitación. Los receptores se han purificado tanto a partir células S2 (Figura 43) como de extractos de tejidos (Figura 44 y 45). Estos experimentos no detectaron una interacción, indicando que ésta o bien no existe o está por debajo del nivel de detección de esta técnica. En particular, al utilizar receptores de lipoforinas purificados a partir de extractos de células S2, no observamos interacción con la lipoforina. Sin embargo, se detecta una interacción robusta con el LTP a pesar de que la hemolinfa contiene unas diez veces más lipoforina circulante que LTP (Figura 43 y 49A), lo que descarta un posible problema técnico. En los ensayos realizados a partir de extractos de glándulas salivales, la interacción detectada era parecida a la observada con un control negativo, la proteína Perdido (Figura 44C y D), lo que podría indicar una tendencia de la lipoforina a formar agregados inespecíficos con otras proteínas.

Estos resultados, sugiriendo una interacción muy débil o nula, concuerdan con nuestros datos obtenidos mediante otras técnicas *in vivo*. En particular, hemos analizado los cambios en distribución de la lipoforina en discos imaginales después de sobre-expresar los receptores

de lipoforinas. En discos imaginales control, la lipoforina se acumula a altos niveles en la matriz extracelular alrededor de las células. Esta distribución de lipoforina total no cambia apreciablemente después de expresar los receptores de lipoforinas. Sin embargo, si los discos son incubados antes de su fijación en tampón o en medio de cultivo, la lipoforina que no está asociada estrechamente al tejido puede difundir de manera que sólo detectamos la fracción retenida por su interacción con sus receptores. En estos experimentos, también se bloqueó la endocitosis con el fin de aumentar la cantidad de receptor en la membrana plasmática. Así, pudimos observar una muy ligera acumulación de lipoforina en la membrana basolateral al expresar Lpr2F y a una acumulación mucho mayor para Lpr2E (Figura 46 y Parra-Peralbo and Culi, 2011). Sin embargo, en el caso de Lpr2E la interacción es indirecta estando mediada por el LTP, como se discutirá más adelante (Figura 55).

El conjunto de todos estos resultados nos sugiere que la interacción del receptor de lipoforina con la lipoforina es muy débil y/o transitoria. Esto concuerda con las medias-altas constantes de disociación calculadas para el LDLR humano con su ligando LDL o sugeridas para el receptor de lipoforina presente en el cuerpo graso del insecto *Galleria mellonella* con la lipoforina, utilizando ensayos de *far-western* y de unión de ligando a preparados de membrana (K_D : 30-50 mM) (Lee *et al.*, 2003b). Además, la interacción presentaba una dinámica saturable, sugiriendo que estaba mediada por un receptor (Lee *et al.*, 2003b). Resultados parecidos se obtuvieron también en *Manduca sexta* (Tsuchida and Wells, 1990). A modo de comparación, la constante de disociación para la interacción fuerte antígeno-anticuerpo es del orden pMolar (pM).

Para poder detectar interacciones con constantes de disociación similares, otros laboratorios han usado la técnica de Resonancia de plasmones de superficie (SPR, del inglés, *Surface Plasmon Resonance*) con resultados positivos para el receptor LDLR. En Martínez-Oliván *et al.*, 2014, describen la unión de ApoB y ApoE al dominio LA5 del receptor mediante esta técnica. Y en Kurasawa *et al.*, 2013, lo usaron para determinar la unión de LDLR con el factor VIII de coagulación. Sería interesante utilizar esta tecnología para corroborar de manera cuantitativa la unión de la lipoforina con las distintas isoformas de los receptores de lipoforinas y ver si hay diferencias entre ellas.

La dificultad para detectar la interacción entre los receptores de lipoforinas con la lipoforina nos imposibilitó, por tanto, identificar la región de unión entre ellos. No obstante, la interacción del receptor mediante el dominio LA1 extendido con la lipoproteína LTP probablemente descarta, por razones estéricas, su intervención en el proceso. En *Locusta migratoria* gracias a experimentos con receptores híbridos entre HDLp y el LDLR humano expresados en células CHO y utilizando ensayos de citometría de flujo *in vivo*, se determinó que el dominio fundamental para la unión de los receptores de lipoforinas con la lipoforina es el LA3, descartándose la participación del dominio LA1 (Roosendaal *et al.*, 2008). Por otra parte, en mamíferos, observaron como la delección de los dominios LA1-2 de los receptores LDLR tenían muy poco efecto sobre la unión con el LDL, siendo fundamentales los dominios LA3-7 para la interacción (Esser *et al.*, 1988; Russell *et al.*, 1989). Estos datos, podrían indicar que la unión de los receptores de lipoforinas de *Drosophila melanogaster* con la lipoforina estaría mediado por los dominios de unión a ligando, posiblemente a partir del tercer LA (LA3). Teniendo en cuenta que los dominios LA3 y LA4 sólo se encuentran en algunas isoformas, ello podría afectar sus afinidades para la lipoforina (Figura 14).

3. Los receptores de lipoforinas endocitan la lipoforina independientemente de la toma de lípidos

Tanto en *Drosophila* como en otros insectos, la adquisición de lípidos celular no requiere la endocitosis de la lipoforina (Dantuma *et al.*, 1997; Parra-Peralbo and Culi, 2011). No obstante, se ha descrito como los receptores de lipoforinas tienen la capacidad de endocitar las lipoproteínas en células transfectadas y en tejidos como por ejemplo el cuerpo graso de larvas y de adultos jóvenes y en discos imaginales de ala (Dantuma *et al.*, 1997; 1999; Callejo *et al.*, 2008). En *Drosophila*, mostraron como la isoforma Lpr2F, la cual no media la toma de lípidos, se detectaba en endosomas tanto tempranos como tardíos junto con la lipoforina en discos imaginales de ala (Callejo *et al.*, 2008). Sin embargo, se desconoce cuál es el papel que desempeña este proceso.

A diferencia de mamíferos, el complejo lipoproteína-receptor es resistente al pH ácido endosomal y no se disocia, de manera que se ha propuesto que la lipoforina, después de su endocitosis, es reciclada junto con el receptor en lugar de degradarse (Roosendaal *et al.*, 2008). Además, en *Manduca sexta*, se observó que los receptores son reciclados siguiendo la misma ruta que la transferrina (Van Hoff *et al.*, 2002). Los detalles de cómo podría funcionar este mecanismo de reciclaje de la lipoforina mediado por sus receptores se desconoce.

Para averiguar si la capacidad de endocitar lipoforina podría estar relacionada con la toma de lípidos, comparamos las isoformas Lpr2E y Lpr2F, mostrando que ambas poseían una capacidad similar de endocitar grandes cantidades de lipoforina, independientemente de si median o no la toma de lípidos (Figura 47 y 48). Además, al bloquear la endocitosis en discos imaginales de ala en clones del alelo *shi^{ts}* no se aprecia una disminución en las inclusiones lipídicas (Figura 47), evidenciando que la endocitosis de lipoforinas no se requiere para la toma de lípidos en este tejido, al igual que en el ovario. Esta endocitosis podría ser un mecanismo para la adquisición de especies lipídicas distintas a los DAG, o podría ejercer una función no relacionada con el metabolismo lipídico, ya que la lipoforina desempeña funciones más allá del metabolismo de lípidos. El hecho de que la endocitosis se detecte principalmente en la región apical del disco, en contraste con la acumulación de LTP y la toma de lípidos, que ocurre en basolateral, apoya la hipótesis de que ambos procesos son independientes (Figura 62).

Existen dos posibilidades que explicarían el incremento en la endocitosis de lipoforina después de sobre-expresar los receptores de lipoforinas. Una es que la interacción de la lipoforina con los receptores, aunque débil, sea suficiente como para mediar su endocitosis. La segunda, que creemos más probable, es que la simple expresión de los receptores de lipoforinas incremente la cantidad total de endocitosis. Al ser la lipoforina una proteína muy abundante en la matriz que rodea a las células, su endocitosis se incrementaría de forma inespecífica.

Varios datos indican que los receptores de lipoforinas están regulados a múltiples niveles y que posiblemente ejerzan funciones específicas en distintos contextos. De un lado, existen una gran variedad de isoformas tanto en *Drosophila melanogaster* como en otros insectos, de manera que los distintos módulos proteicos que los forman pueden afectar a sus propiedades y funciones. Por otro lado, la regulación transcripcional de estos receptores depende de cambios fisiológicos y requerimientos energéticos del organismo y del tejido donde se expresan. Por ejemplo, en el mosquito de la fiebre amarilla *Aedes aegypti*, el patrón de expresión de los dos genes de receptores de lipoforinas (*AaLpRov* y *AaLpRfb*) es distinto

entre ellos y además depende del estadio del organismo. Así, *AaLpRfb* se expresa en el cuerpo graso durante el periodo post-vitelogénico para la re-absorción de lípidos, mientras que *AaLpRov* se detecta en el ovario durante todos los estadios vitelogénicos (Seo *et al.*, 2003).

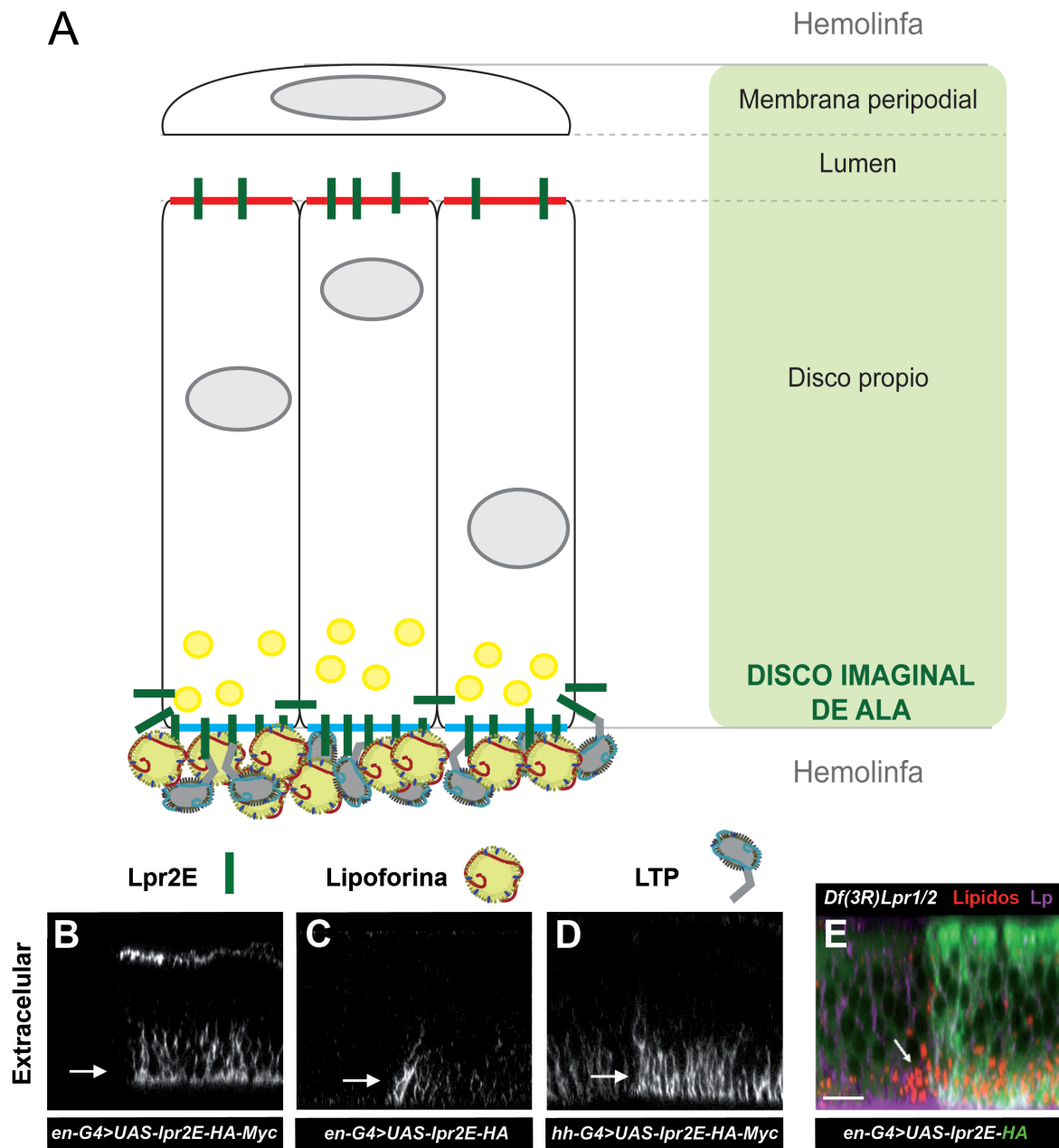


Figura 62. Disposición de los distintos elementos implicados en la toma de lípidos en discos imaginales de ala. (A) Dibujo representativo de una sección transversal del disco imaginal de ala, en el cual tiene lugar la adquisición de lípidos en la región basal. Las distintas partes se exponen a la izquierda. La membrana apical se muestra en rojo y la basal en azul. Tinciones extracelulares del receptor Lpr2E detectado con α -Myc (B), la lipoforina con α -Lp (C) y el LTP con α -LTP (D) en discos imaginales de ala sobre-expresando la isoforma Lpr2E en el compartimento posterior. (E) Expresión de UAS-Lpr2E-HA en discos mutantes para los receptores *lpr1* y *lpr2*. El receptor se detectó con α -HA en verde, la lipoforina con α -Lp en magenta y los lípidos neutros en rojo con Nile red. Tomada de Parra-Peralbo and Culi, 2011. Las flechas señalan la región basolateral donde se acumulan preferencialmente tanto el receptor como las lipoproteínas Lipoforina y LTP, así como las inclusiones lipídicas. Barra de escala: 10 μ m. Todos los paneles se muestran al mismo tamaño.

4. La lipoproteína LTP es indispensable para la adquisición de lípidos en tejidos periféricos. Mecanismo de acción

Los mecanismos moleculares que median la toma de lípidos en *Drosophila* se han empezado a esclarecer recientemente. Así, se ha visto que en tejidos periféricos como los ovarios o los discos imaginales, requiere de los receptores de lipoforina y es independiente de endocitosis (Parra-Peralbo and Culi, 2011). Sin embargo, se ignora el mecanismo molecular por el cual los lípidos se internalizan en estos tejidos. En esta tesis, hemos caracterizado como el LTP, un nuevo ligando de los receptores de lipoforinas, participa en estos procesos y desempeña un papel clave en ellos.

En primer lugar, hemos visto que el LTP únicamente interacciona *in vitro* con aquellas isoformas de los receptores de lipoforinas capaces de mediar la adquisición de lípidos (como Lpr2E) (Figura 49). Además, la expresión de los receptores de lipoforinas en la membrana plasmática de tejidos periféricos como son los discos imaginales o los ovarios, lleva a su vez a la acumulación de LTP. En segundo lugar, la reducción de los niveles de LTP en circulación lleva a una disminución de los niveles de lípidos neutros en discos imaginales y ovarios (Figura 50). Se ha descrito que el LTP se requiere para la transferencia de los lípidos procedentes de la dieta desde el intestino hacia la lipoforina circulante (Palm *et al.*, 2012). Por tanto, es posible que la reducción en la cantidad de lípidos en tejidos periféricos observada al silenciar el LTP se deba a una disminución en la cantidad de lípidos circulantes disponibles para los tejidos (Palm *et al.*, 2012). Sin embargo, nuestros datos antes expuestos junto con los de otros laboratorios demuestran una implicación directa del LTP en este proceso, aunque no descartamos una combinación de ambos efectos. Una de las pruebas más concluyentes se describe en Jouni *et al.*, 2003. En este artículo se muestra que en insectos como *Bombyx mori*, al incubar ovariolas en medio de cultivo conteniendo lipoforinas marcadas, se producía una transferencia de lípidos desde las lipoforinas a las ovariolas. Esta transferencia era inhibida con un anticuerpo frente al LTP (anti-LTP) y se recuperaba al suplementar de nuevo el medio con LTP purificado, demostrando así una implicación directa del LTP en la transferencia de lípidos desde la lipoforina a las ovariolas.

¿Qué papel desempeña el LTP en la transferencia de lípidos desde las lipoforinas a las células? Como ya se ha expuesto en la introducción, el LTP cataliza el intercambio de diversas especies lipídicas como el DAG, fosfolípidos y ésteres de colesterol entre lipoproteínas o entre lipoproteínas y células. En este sentido, se lo ha comparado con las proteínas transportadoras de ésteres de colesterol (CETP) o de fosfolípidos (PLTP) de mamíferos. Sin embargo, en contraste con el CETP, el LTP no actúa formando un complejo ternario entre el donador y el aceptor, sino que puede actuar de forma secuencial, cargándose primero de lípidos y cediéndolos luego en una etapa posterior (Blacklock *et al.*, 1992). La estructura del LTP sugiere un posible mecanismo molecular para ello. Estudios con microscopía electrónica han desvelado la particular forma de esta lipoproteína, compuesta por dos partes bien diferenciadas, una cabeza globular donde podrían almacenarse los lípidos y una cola flexible que podría mediar la interacción con otras partículas o con receptores celulares (Figura 10).

Teniendo en cuenta esta información y nuestros datos, proponemos que el LTP circulante es reclutado a las membranas plasmáticas basolaterales de las células gracias a su interacción con los receptores de lipoforinas, tal vez a través del dominio en forma de cola del LTP, aumentando así su concentración local. Una vez unido, interacciona secuencialmente con las lipoforinas

cargadas de lípidos adsorbidas a la matriz extracelular que rodea a las células y con la membrana plasmática, transfiriendo una determinada cantidad de lípidos en cada ciclo. Los datos que apoyan este modelo son los siguientes:

(1) Existe un *pool* de lipoforinas asociado a la matriz extracelular que rodea a las células, tal y como hemos observado mediante inmunotinciones. Este *pool* es probablemente muy dinámico, ya que rápidamente disminuye al incubar los tejidos en un medio libre de lipoforina (por ejemplo, Figura 55). Proponemos que esta lipoforina se encuentra débilmente asociada a la matriz extracelular mediante interacciones de baja afinidad con los HSPG (Eugster *et al.*, 2007), con los receptores de lipoforinas o con otros receptores no identificados por el momento (Figura 63A). De forma similar, en *Locusta migratoria* se ha mostrado mediante experimentos inmunohistoquímicos, que la lipoforina se localiza fundamentalmente en la matriz extracelular que rodea las membranas plasmáticas del músculo del vuelo (Van Antwerpen *et al.*, 1988). Es interesante destacar que, en *Manduca sexta*, se ha observado como en el cuerpo graso larvario existe un pool de lípidos extracelular asociado a la parte externa de la membrana plasmática. Es probable que estos lípidos estén contenidos en las lipoforinas adsorbidas a la matriz extracelular que nosotros hemos observado y pueden suponer un intermediario en el proceso de transferencia de lípidos a las células, donde el LTP y los receptores de lipoforinas se requieren y participan activamente (Canavoso *et al.*, 2004).

(2) En Parra-Peralbo and Culi, 2011, se estableció que en *Drosophila melanogaster* el dominio LA1 de las isoformas transcritas a partir del promotor distal, es indispensable para la adquisición de lípidos celular. En esta tesis hemos esclarecido que la interacción entre el receptor y la lipoproteína LTP requiere precisamente de este dominio LA1, que posiblemente se una a la región flexible del LTP, dejando así libre la región globular para facilitar el contacto con la lipoforina y la membrana plasmática (Figura 63A). Por tanto, hay una perfecta correlación entre aquellas isoformas que unen al LTP y su capacidad de mediar la toma de lípidos, sugiriendo que los dos procesos están relacionados. Esta unión LTP-dominio LA1 del receptor se ve incrementada por la presencia de 16 aminoácidos adyacentes, formando el que hemos denominado dominio extendido (LA1+ED) (Figura 51), asignando por primera vez funcionalidad al dominio NCN.

Dada la relevancia funcional del dominio LA1, analizamos su secuencia en los receptores de lipoforinas de diferentes géneros de *Drosophila* con el fin de identificar las particularidades que lo distinguen de otros dominios LA. El resultado de este estudio desveló un grupo de residuos cargados en la región N-terminal (D/EEK) ausentes en otros dominios LA, que podrían aportar la especificidad de unión al LTP (Figura 52). Estos residuos se encuentran adyacentes a los 16 aminoácidos del ED, sugiriendo que podrían constituir un dominio estructural junto a estos.

(3) Las lipoforinas extracelulares se estabilizan en la membrana plasmática de células que expresan los receptores de lipoforina de forma dependiente de LTP (Figura 63B). Ello lo hemos observado tanto en discos imaginales como en el cuerpo graso (Figuras 53 y 54). Esto sugiere que efectivamente, se produce una interacción entre LTP y lipoforina en las superficies celulares que podría representar un intermediario funcional formado durante el tránsito de los lípidos desde la lipoforina al LTP tal y como proponemos en nuestro modelo. Sin embargo, nuestros datos no apoyan que lipoforina y LTP interaccionen directamente. Por ejemplo, podemos inmunoprecipitar considerables cantidades de LTP de la hemolinfa utilizando de cebo el receptor Lpr2E. En estas condiciones, la lipoforina no co-inmunoprecipita junto al LTP sugiriendo que no interaccionan directamente en la hemolinfa (Figura 49). Proponemos que

el LTP unido a los receptores de lipoforinas expresados en la membrana plasmática a través de interacciones de alta afinidad, interactúa con la lipoforina adsorbida a la matriz extracelular y de esta forma toma parte de su carga lipídica. Esta interacción estabilizaría de forma transitoria a la lipoforina en la región. Es posible que otra interacción, de baja afinidad, entre la lipoforina y los receptores de lipoforina ayude a que se forme el complejo receptor-LTP-lipoforina. Esto lo sugieren nuestros experimentos en los que expresamos *lpr2E*, que no interacciona con el LTP pero si induce una ligera acumulación de lipoforina (Figuras 51 y 46). Finalmente, el ciclo se completa con la transferencia de lípidos desde el LTP a la célula (Figura 63C).

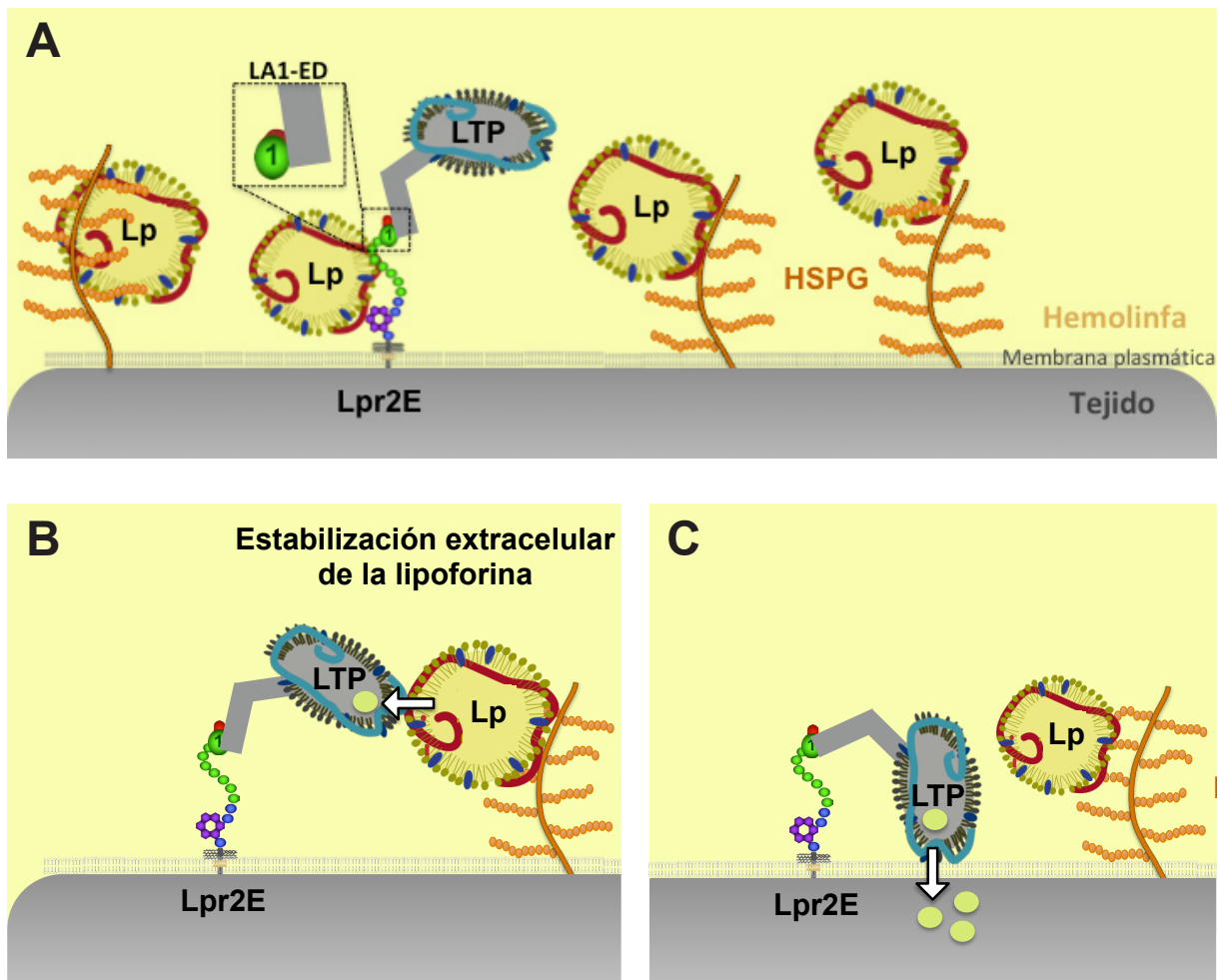


Figura 63. Modelo molecular para la toma de lípidos celular en tejidos periféricos de *Drosophila*. (A) Por un lado, la lipoforina se localiza en la matriz extracelular de los tejidos periféricos unida débilmente a los heparán sulfatos proteoglicanos (HSPG), a los receptores de lipoforinas u otros receptores desconocidos. Por otro lado, el LTP circulante se une probablemente por su región elongada al dominio LA1 extendido de los receptores (LA1-ED). (B) La interacción del LTP con el receptor promueve la estabilización de la lipoforina. A su vez, transfiere lípidos desde la lipoforina hacia el LTP, donde se acumulan probablemente en la región globular. (C) Posteriormente, los lípidos neutros son transferidos hacia la célula del tejido de manera hasta ahora desconocida. La lipoforina delipidada podría liberarse a la hemolinfa para llegar a un tejido fuente (cuerpo graso o intestino), donde tendría lugar la carga de lípidos.

Como hemos discutido previamente, no hemos podido detectar interacción *in vitro* entre los receptores de lipoforinas y la lipoforina, indicando que es muy débil. Si bien este dato puede parecer contra intuitivo, esta interacción débil puede ser importante para permitir un flujo constante de nuevas partículas de lipoforina, cargadas de lípidos, hacia los complejos LTP-receptor anclados de manera estable a la superficie celular. Una interacción de alta afinidad enlentecería el recambio de las lipoforinas, que permanecerían unidas al receptor una vez ya delipidadas bloqueándose así la transferencia de lípidos. En la Figura 55 mostramos como si bien inicialmente tanto la lipoforina como el LTP se estabilizan en las membranas plasmáticas de células que expresan Lpr2E, la unión del LTP es estable a lo largo del tiempo, mientras que la lipoforina se disocia al cabo de pocos minutos de incubación en tampón. Se nos ocurren dos posibilidades para explicar esta transitoriedad. De un lado, es posible que la lipoforina se una al receptor de lipoforinas y al LTP de forma cooperativa pero aun así, con baja afinidad, de forma que se disocia del complejo espontáneamente. La segunda posibilidad es que la afinidad de la lipoforina por el complejo receptor-LTP disminuya al delipidarse ésta o al lipidarse el LTP. Es decir, el complejo trimérico receptor-LTP-lipoforina sólo sería estable mientras ocurriera la transferencia de lípidos desde la lipoforina al LTP. Algunos datos pueden apoyar esta posibilidad. En *Manduca sexta*, la afinidad de la lipoforina por sus receptores del cuerpo graso depende del contenido lipídico de ésta, de manera que lipoforinas con bajo contenido en DAG se unen con menos afinidad que las ricas en lípidos. Esta propiedad podría facilitar el transporte direccional de lípidos entre tejidos (Tsuchida and Wells, 1990).

Por otro lado, se ha demostrado que el LTP es un catalizador muy eficiente. Por ejemplo, en Ryan *et al.*, 1990c se muestra una transferencia de DAG entre HDLp de *Manduca sexta* y LDL de mamíferos. Cuando se incuban LDL conteniendo DAG marcado con HDLp en presencia o ausencia de LTP se observa como sólo en presencia de LTP ocurre transferencia de lípidos, que además es dependiente de la concentración del donador, sugiriendo que el LTP es muy eficiente catalíticamente. Además, en otros insectos como por ejemplo *Bombyx mori* la tasa de transferencia de DAG, catalizada por LTP, es muy rápida comparada con otras moléculas como los carotenos. En estos experimentos usaron como donador HDLp marcadas con [³H]-DAG y como aceptor LDLp (pobres en carotenos), incubándose en presencia de LTP. Tras su posterior purificación por ultracentrifugación de gradiente de densidad KBr y separación en fracciones, se midió la radiactividad de las fracciones elegidas, y observaron como la tasa de transferencia de DAG *in vitro* es muy rápida en comparación con los carotenoides: a los 5 minutos el DAG marcado llegó al equilibrio, mientras que los carotenoides tardaron entorno a 4 horas (Tsuchida *et al.*, 1998).

Una importante incógnita todavía no resuelta es el mecanismo de entrada de lípidos desde el LTP al interior de las células. Éstos podrían transferirse a la membrana plasmática directamente o a través de otro factor hasta ahora desconocido.

Según nuestra hipótesis, el reclutamiento del LTP por parte de los receptores de lipoforinas en la región extracelular es el primer paso para que la toma de lípidos tenga lugar. Intentamos llevar a cabo este reclutamiento del LTP mediante receptores quiméricos compuestos del dominio N-terminal (LA1+NCN) de Lpr2E fusionado a otra proteína de superficie. Sin embargo, los receptores quiméricos contruidos a partir de los receptores de la familia de los LDLR de mamíferos no fueron capaces de unir el LTP *in vivo*. Esto puede deberse a la toxicidad celular producida por la sobre-expresión de estas proteínas quiméricas (Figuras 56, 57 y 58). Durante estos experimentos observamos como el receptor VLDLR humano tiene cierta capacidad de

unión con el LTP y que el primer dominio de unión a ligando es el que aporta esta capacidad. El significado funcional de esta interacción es difícil de predecir. Es destacar que, al comparar las secuencias reparamos en que existe un residuo hidrofóbico de leucina (Leu48) conservado así como un residuo cargado positivamente en la parte N-terminal del dominio (Asp34) que podrían participar en la unión al LTP.

Relevancia de la endocitosis del LTP para su función

Nuestros datos demuestran que los lípidos de la lipoforina se descargan en los tejidos periféricos gracias al LTP por un mecanismo independiente de endocitosis. Por el contrario, en los enterocitos la endocitosis del LTP es un evento clave para que las lipoforinas se carguen de lípidos (Palm *et al.*, 2012). Esta endocitosis podría estar mediada en parte, por los receptores de lipoforinas, ya que éstos se expresan en el intestino y nosotros hemos demostrado que son capaces de mediar la endocitosis del LTP (Figura 49C). No obstante, la falta de función de los receptores de lipoforinas no produce el fenotipo de acumulación de lípidos en el intestino característico del silenciamiento de *apoLTP* (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015). Esto indica que aunque los receptores de lipoforinas pudieran contribuir a la endocitosis del LTP en el intestino, deben existir otros receptores redundantes. La función que desempeña la endocitosis del LTP en discos imaginales de ala o en los ovarios se desconoce. Quizás, la transferencia de algunas especies lipídicas distintas al DAG la requiera. Probablemente se puede descartar el colesterol, ya que en ensayos *in vitro* entre la lipoforina y el cuerpo graso de *Manduca sexta*, el intercambio de colesterol requiere del LTP pero no así del proceso de endocitosis (Jouni *et al.*, 2002). Otra posibilidad es que simplemente forme parte de un mecanismo de desensibilización cuando la toma de lípidos ya no sea necesaria y que lleve a la degradación del LTP.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en *Drosophila* y en otros insectos, es probable que el LTP participe en la transferencia de lípidos por dos mecanismos distintos, uno dependiente de endocitosis y el otro no. Es de destacar que sólo en este último caso los receptores de lipoforinas son esenciales. Por tanto proponemos estos dos mecanismos para el LTP:

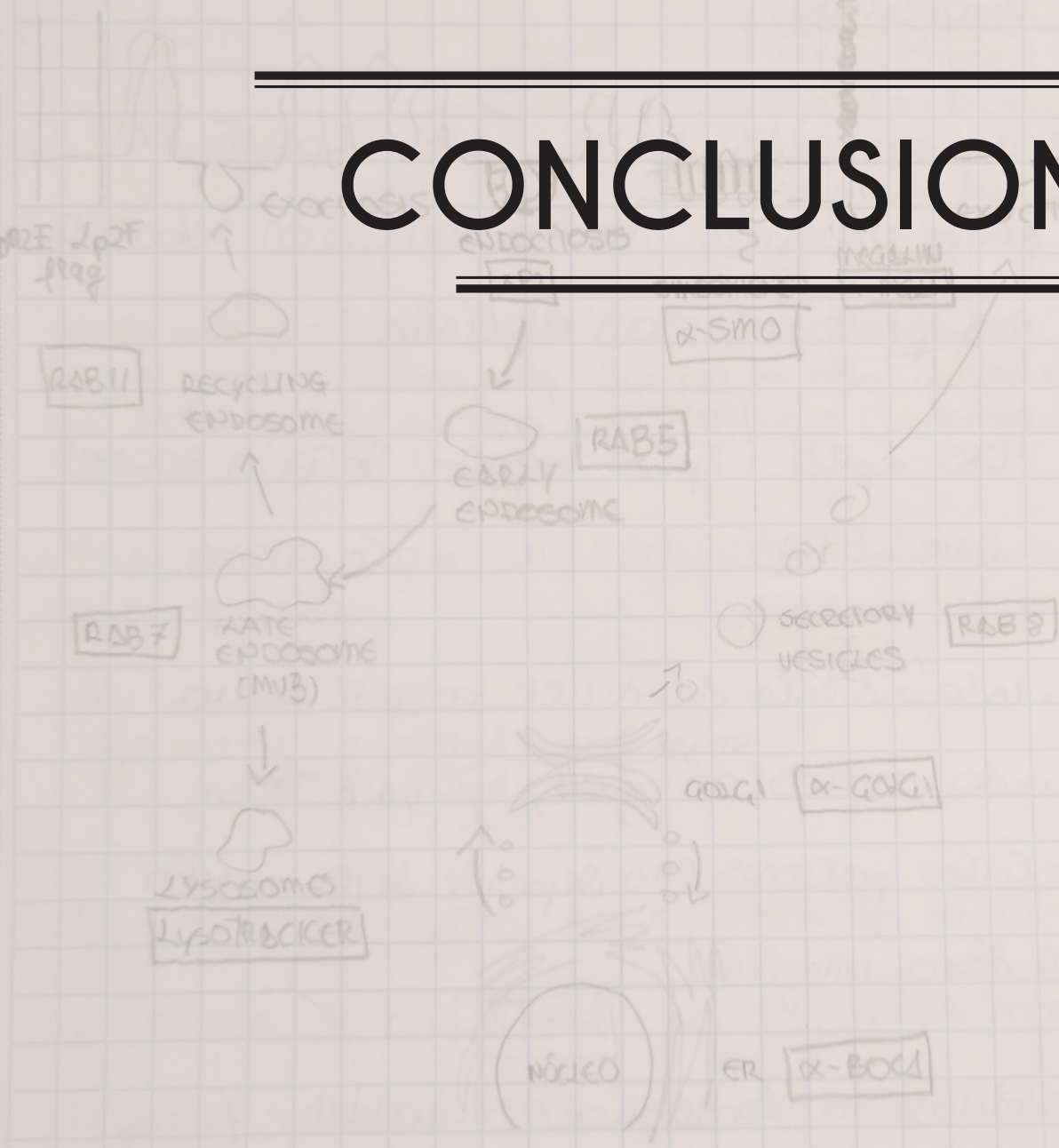
1. Mediando la transferencia de lípidos desde un tejido hacia la lipoforina. Este sería independiente de los receptores de lipoforinas pero requeriría de endocitosis de la lipoproteína LTP.

2. Descargando los lípidos desde la lipoforina hacia un tejido, de manera independiente a la endocitosis pero requiriendo la presencia de los receptores de lipoforinas.

En la literatura encontramos datos que apoyan estos dos mecanismos de acción. Ensayos *in vitro* realizados en *Bombyx mori* y otros insectos, mostraron que la transferencia de DAG desde la lipoforina hacia las ovariolas aumenta cuando se incrementa la concentración de lipoforinas pero siguiendo una dinámica saturable (Jouni *et al.*, 2003). Ello es consistente con un mecanismo mediado por receptores. La presencia de los receptores de lipoforinas también es fundamental para la transferencia de lípidos desde la lipoforina al cuerpo graso larvario de *Manduca sexta* (Canavoso *et al.*, 2004).

TIPOIDN
EXMACGLOBO

CONCLUSIONES



1. Las isoformas de los receptores de lipoforinas muestran distintas distribuciones subcelulares al ser sobre-expresadas. Ello depende principalmente del péptido señal que presenten, ya sea típico (isoformas transcritas desde el promotor proximal) o atípicamente largo (promotor distal).
2. El péptido señal atípicamente largo es 10 veces menos eficiente en mediar la traducción que el típico, al menos en los tejidos examinados. Además, esta diferencia no se debe a su longitud, si no a otras propiedades intrínsecas de éste.
3. Los altos niveles de sobre-expresión logrados mediante transgenes que contienen el péptido señal típico resultan en la activación de apoptosis. Ello puede llevar a la pérdida de inmunoreactividad de las proteínas que contienen el epítipo HA.
4. No hay diferencias entre la distribución de las isoformas Lpr2E y Lpr2F en los compartimentos endocíticos, secretores, ni en la membrana plasmática, donde se localizan principalmente en las membranas basolaterales.
5. Los receptores de lipoforinas interaccionan débilmente con su ligando clásico, la lipoforina. Esta interacción, sólo se ha podido observar en experimentos *in vivo*.
6. Las isoformas Lpr2E y Lpr2F muestran capacidades parecidas para endocitar lipoforinas a tiempos cortos, aunque ello no es necesario para la toma de lípidos en discos imaginales.
7. El LTP es un nuevo ligando de los receptores de lipoforinas que median la adquisición de lípidos. Sólo las isoformas que contienen el dominio LA1 extendido (LA1-ED) son capaces de interaccionar con el LTP.
8. Los receptores de lipoforinas son necesarios para la acumulación del LTP en las membranas plasmáticas de tejidos donde la adquisición de lípidos tiene lugar: discos imaginales y ovarios.
9. La falta de función de *apoLTP* produce una reducción drástica del contenido lipídico en ovarios y menos severo en discos imaginales de ala.
10. El LTP es esencial para la toma de lípidos en tejidos periféricos. Media la transferencia de lípidos neutros desde lipoforinas circulantes hasta la membrana plasmática. Ello lleva a una estabilización transitoria de la lipoforina en la membrana plasmática que hemos observado tanto en discos imaginales como en el cuerpo graso.
11. Los receptores de lipoforinas son capaces de mediar la endocitosis del LTP, a pesar de que ello no se requiere para la toma de lípidos.
12. El dominio LA1 de *Drosophila* contiene residuos cargados positivamente cerca del dominio extendido. Estos residuos están conservados en otras especies, lo que sugiere que podrían ser claves para permitir la interacción con el LTP.

CONCLUSIONES

13. El receptor VLDLR humano es capaz de unir débilmente el LTP. El dominio LA1 del receptor también es clave para esta unión.

14. La Peroxidasina es un ligando para los receptores de lipoforinas ajeno al metabolismo de lípidos. Ambas isoformas, Lpr2E y Lpr2F, parecen tener la misma capacidad de unión con la Peroxidasina *in vitro*.

Reduction of the LpLR results in loss of ligand binding. Cutler and Little, 1998). LpLR is an unusually stable protein, this stability could be attributed to the presence of 21 dis-S bonds in Lp domains.

Reducing conditions: Lpr 1 mass (breakage of dis-S bonds)
EDTA (divalent cation chelant)

ARM a 20 kDa de cada lado, afecta los niveles de proteínas.

BIBLIOGRAFÍA

Regulación Eraduccional o post-Traduccional

↑ Lpr 1 20 kDa (proteína)
↑ Protein levels

⊗ nada a los niveles de ARM.

The first study for the LpLR receptor was performed by Oram, 1983 and its function have been questioned Karsenti 1987.

Tsukada and Wells (1990) Lpr in Manduca sexta FB

Lp : 50/60% protein (Ching and Kikazawa, 1981)

40/50% Lipids (DBG) (Shapiro et al, 1984)

Lp Lipids from midgut → FB (Tsukada and Wells 1988)

Van Haff et al (2002) insect Lpr expressed in CHO cells and in Drosophila Lp Lp, in contrast to LpLR pathway in a non-lysosomal recycling compartment.

the Lp-domain critical role in receptor and ligand binding (Brown and Goedstern, 1986)

Importancia of dis-S, encondones reductores de actividad de receptor
se ve inhibida (Moesrup et al 1993)

Lpr binding protein Morita did not depend on Ca^{2+} (Godin & Wells, 2000)

- Acland** P, Dixon M, Peters G, Dickson C (1990). Subcellular fate of the int-2 oncoprotein is determined by choice of initiation codon. *Nature*. 343(6259): 662-5.
- Alfa** RW and Kim SK (2016). Using *Drosophila* to discover mechanisms underlying type 2 diabetes. *Dis Model Mech*. 9(4): 365-76.
- Andersen** OM, Dagil R, and Kragelund BB (2013). New horizons for lipoprotein receptors: communication by β -propellers. *J Lipid Res*. 54(10): 2763-2774.
- Ando** S, Ryan RO, Yokoyama S (1990). Lipid transfer between human plasma low-density lipoprotein and a triolein/phospholipid microemulsion catalyzed by insect hemolymph lipid transfer particle. *Biochim Biophys Acta*. 1043(3): 289-94.
- Arrese** EL, Canavoso LE, Jouni ZE, Pennington JE, Tsuchida K and Wells MA (2001). Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochem Mol Biol*. 31(1): 7-17.
- Atkins** AR, Brereton IM, Kroon PA, Lee HT and Smith R (1998). Calcium is essential for the structural integrity of the cysteine-rich, ligand-binding repeat of the low-density lipoprotein receptor. *Biochemistry*. 37 :1662–1670.
- Babin** PJ, Lim EH, Lam TJ and Ding JI (1994). Two major groups of vitellogenin cDNA in *Oreochromis aureus* (Steindachner). *Biochem Mol Biol Int*. 34: 75-83.
- Backlock** BJ and Ryan RO (1994). Hemolymph lipid transport. *Insect Biochem Mol Biol*. 24(9): 855-73.
- Beenakers** AMT, Van der Horst DJ, and Van Marrewijk WJ (1985). Insect lipids and lipoproteins, and their role in physiological processes. *Prog. Lipid Res*. 24: 19–67.
- Beglova** N, North CL and Blacklow SC (2001). Backbone dynamics of a module pair from the ligand-binding domain of the LDL receptor. *Biochemistry*. 40(9): 2808-15.
- Belin** D, Wohlwend A, Schleuning WD, Kruithof EK, Vassalli JD (1989). Facultative polypeptide translocation allows a single mRNA to encode the secreted and cytosolic forms of plasminogen activators inhibitor 2. *EMBO J*. 8(11): 3287-94.
- Bendtsen** JD1, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*. 340(4): 783-95.
- Bergantiños** C, Vilana X, Corominas M, Serras F (2010). Imaginal discs: Renaissance of a model for regenerative biology. *32(3)*: 207-17.
- Bhave** G, Cummings CF, Vanacore RM, Kumagai-Cresse C, Ero-Tolliver IA, Rafi M, Kang JS, Pedchenko V, Fessler LI, Fessler JH, Hudson BG (2012). Peroxidase forms sulfilimine chemical bonds using hypohalous acids in tissue genesis. *Nat Chem Biol*. 8(9): 784-90.
- Birse** RT, Choi J, Reardon K, Rodriguez J, Graham S, Diop S, Ocorr K, Bodmer R and Oldham S (2010). High-fat-diet-induced obesity and heart dysfunction are regulated by the TOR pathway in *Drosophila*. *Cell Metab*. 12(5): 533-44.

Bischof J, Maeda RK, Hediger M, Karch F, Basler K (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 104(9): 3312-7.

Blacklock BJ and Ryan RO (1995). Structural studies of *Manduca sexta* lipid transfer particle with apolipoprotein-specific antibodies. *J Lipid Res.* 36(1): 108-16.

Blacklock BJ, Smillie M, Ryan RO (1992). Insect lipid transfer particle can facilitate net vectorial lipid transfer via a carrier-mediated mechanism. *J Biol Chem.* 267(20): 14033-7.

Blacklow SC and Kim PS (1996). Protein folding and calcium binding defects arising from familial hypercholesterolemia mutations of the LDL receptor. *Nat Struct Biol.* 3(9): 758-62.

Blake SM, Strasser V, Andrade N, Duit S, Hofbauer R, Schneider WJ, Nimpf J (2008). Thrombospondin-1 binds to ApoER2 and VLDL receptor and functions in postnatal neuronal migration. *EMBO J.* 27(22): 3069-80.

Bodmer R and Venkatesh TV (1998). Heart development in *Drosophila* and vertebrates: conservation of molecular mechanisms. *Dev Genet.* 22(3): 181-6.

Borén J, Lee I, Zhu W, Arnold K, Taylor S, Innerarity TL (1998). Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *J Clin Invest.* 101(5): 1084-93.

Bovenschen N, Rijken DC, Havekes LM, van Vlijmen BJ, Mertens K (2005). The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J Thromb Haemost.* 3(6): 1257-65.

Brand AH and Perrimon N (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 118: 401-415.

Brankatschk M, Dunst S, Nemetschke L, Eaton S (2014). Delivery of circulating lipoproteins to specific neurons in the *Drosophila* brain regulates systemic insulin signaling. *Elife.* 3: e02862.

Broughton SJ, Piper MD, Ikeya T, Bass TM, Jacobson J, Driege Y, Martinez P, Hafen E, Withers DJ, Leivers SJ and Partridge L (2005). Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 102(8): 3105-10.

Brown MS and Goldstein JL (1975). Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. *Cell.* 6(3): 307-16.

Brown MS and Goldstein JL (1976). Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science.* 191(4223): 150-4.

Brown MS and Goldstein JL (1986). A Receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 232(4746): 34-47.

- Bu G**, Geuze HJ, Strous GJ, Schwartz AL (1995). 39 kDa receptor-associated protein is an ER resident protein and molecular chaperone for LDL receptor-related protein. *EMBO J.* 14: 2269-2280.
- Callejo A**, Culi J, Guerrero I (2008). Patched, the receptor of Hedgehog, is a lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 105(3): 912-7.
- Canavoso LE** and Wells MA (2000). Metabolic pathways for diacylglycerol biosynthesis and release in the midgut of larval *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol.* 30(12): 1173-80.
- Canavoso LE** and Wells MA (2001). Role of lipid transfer particle in delivery of diacylglycerol from midgut to lipophorin in larval *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol.* 31(8): 783-90.
- Canavoso LE**, Bertello LE, de Lederkremer RM and Rubiolo ER (1998). Effect of fasting on the composition of the fat body lipid of *Dipetalogaster maximus*, *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *J Comp Physiol B.* 168(7): 549-54.
- Canavoso LE**, Jouni ZE, Karnas KJ, Pennington JE and Wells MA (2001). Fat metabolism in insects. *Annu Rev Nutr.* 21: 23-46.
- Canavoso LE**, Yun HK, Jouni ZE, Wells MA (2004). Lipid transfer particle mediates the delivery of diacylglycerol from lipophorin to fat body in larval *Manduca sexta*. *J Lipid Res.* 45(3): 456-65.
- Capurro ML** and de Bianchi AG (1990). lipid transfer particle in *Musca domestica* haemolymph. *Comp Biochem Physiol.* 97B: 649-653.
- Casso DJ**, Liu S, Biehs B, Kornberg TB (2012). Expression and Characterization of *Drosophila* Signal Peptide Peptidase-Like (sppL), a Gene That Encodes an Intramembrane Protease. *PLoS One.* 7(3): e33827.
- Ceccanti M**, Cambieri C, Frasca V, Onesti E, Biasiotta A, Giordano C, Bruno SM, Testino G, Lucarelli M, Arca M, and Inghilleri M (2016). A Novel Mutation in ABCA1 Gene Causing Tangier Disease in an Italian Family with Uncommon Neurological Presentation. *Front Neurol.* 7:185.
- Charles MA** and Kane JP (2012). New molecular insights into CETP structure and function: a review. *J Lipid Res.* 53(8): 1451-8.
- Cheon HM**, Seo SJ, Sun J, Sappington TW, Raikhel AS (2001). Molecular characterization of the VLDL receptor homolog mediating binding of lipophorin in oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 31: 753-760.
- Chien S**, Reiter LT, Bier E and Gribskov M (2002). Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 30(1): 149-51.
- Chino H** and Kitazawa K (1981). Diacylglycerol-carrying lipoprotein of hemolymph of the locust and some insects. *J Lipid Res.* 22(7): 1042-52.

Ciudad L, Bellés X, Piulachs MD (2007). Structural and RNAi characterization of the German cockroach lipophorin receptor, and the evolutionary relationships of lipoprotein receptors. *BMC Mol Biol.* 8: 53.

Clark AG and Keith LE (1988). Variation among extracted lines of *Drosophila melanogaster* in triacylglycerol and carbohydrate storage. *Genetics.* 119(3): 595-607.

Clatworthy AE, Stockinger W, Christie RH, Schneider WJ, Nimpf J, Hyman BT, Rebeck GW (1999). Expression and alternate splicing of apolipoprotein E receptor 2 in brain. *Neuroscience.* 90: 903-911.

Clavey V, Lestavel-Delattre S, Copin C, Bard JM, Fruchart JC (1995). Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII, and E. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 15(7): 963-71.

Clayton RB (1964). The utilization of sterols by insects. *J Lipid Res.* 5:3-19.

Culi J and Mann RS (2003). Boca, an Endoplasmic Reticulum Protein Required for Wingless Signaling and Trafficking of LDL Receptor Family Members in *Drosophila*. *Cell.* 112: 343-354.

Culi J, Springer TA and Mann RS (2004). Boca-dependent maturation of beta-propeller/EGF modules in low-density lipoprotein receptor proteins. *EMBO J.* 23(6): 1372-80.

Dallinga-Thie GM, Franssen R, Mooij HL, Visser ME, Hassing HC, Peelman F, Kastelein JJ, Péterfy M, Nieuwdorp M (2010). The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis.* 211(1): 1-8.

Dantuma NP, Pijnenburg MA, Diederens JH, Van der Horst DJ (1997). Developmental down-regulation of receptor-mediated endocytosis of an insect lipoprotein. *J Lipid Res.* 38(2): 254-65.

Dantuma NP, Potters M, De Winther MP, Tensen CP, Kooiman FP, Bogerd J, Van der Horst DJ (1999). An insect homolog of the vertebrate very low-density lipoprotein receptor mediates endocytosis of lipophorins. *J Lipid Res.* 40: 973-978.

Davis I, Girdham CH, O'Farrell PH (1995). A nuclear GFP that marks nuclei in living *Drosophila* embryos; maternal supply overcomes a delay in the appearance of zygotic fluorescence. *Dev Biol.* 170(2): 726-9.

De Luca M, Yi N, Allison DB, Leips J and Ruden DM (2005). Mapping quantitative trait loci affecting variation in *Drosophila* triacylglycerol storage. *Obes Res.* 13(9): 1596-605.

Dionne MS and Schneider DS (2008). Model of infectious diseases in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Dis Model Mech.* 1(1): 43-9.

Diop SB and Bodmer R (2012). *Drosophila* as a model to study the genetic mechanisms of obesity-associated heart dysfunction. *J Cell Mol Med.* 16(5): 966-71.

Duffy JB (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis.* 34(1-2): 1-15.

- Dultz E**, Hildenbeutel M, Martoglio B, Hochman J, Dobberstein B, Kapp K (2008). The signal peptide of the Mouse Mammary Tumor Virus Rem Protein is released from the endoplasmic reticulum membrane and accumulates in nucleoli. *J Biol Chem.* 283(15): 9966-76.
- Esser V**, Limbird LE, Brown MS, Goldstein JL and Russell DW (1988). Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 263: 13282–13290.
- Eugster C**, Panáková D, Mahmoud A, Eaton S (2007). Lipoprotein-heparan sulfate interactions in the Hh pathway. *Dev Cell.* 13(1): 57-71.
- Farese RV** and Walther TC (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell.* 139: 855–60.
- Fass D**, Blacklow S, Kim PS and Berger JM (1997). Molecular basis of familial hypercholesterolaemia from structure of LDL receptor module. *Nature.* 388(6643):691-3.
- Fauci AS**, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL and Loscalzo J (2008). *Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th Edition*, 17th edn, The McGraw-Hill Companies, USA.
- Fay PJ** (2006). Factor VIII structure and function. *Int J Hematol.* 83(2): 103-8.
- Fielding CJ** and Fielding PE (1995). Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res.* 36 (2): 211-28.
- Fielding CJ** and Fielding PE(2008). Dynamics of lipoprotein transport in the circulatory system. In *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membrane*, E.D.V.a.J.E. Vance, ed. (B. V. Elsevier), pp. 533-552.
- Fisher C**, Abdul-Aziz D, Blacklow SC (2004). A two-module region of the low-density lipoprotein receptor sufficient for formation of complexes with apolipoprotein E ligands. *Biochemistry.* 43(3): 1037-44.
- Fisher C**, Beglova N, Blacklow SC (2006). Structure of an LDLR-RAP Complex Reveals a General Mode for Ligand Recognition by Lipoprotein Receptors. *Mol Cell.* 22(2): 277-83.
- Ford PS** and Van Heusden MC (1994). Triglyceride-rich lipophorin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 31(3): 435-41.
- Fortini ME** and Bonini NM (2000). Modeling neurodegenerative diseases in *Drosophila*: on a wing and a prayer. *Trends Genet.* 16(4): 161-7.
- Gilbert LI**, Rybczynski R, Warren JT (2002). Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu Rev Entomol.* 47: 883-916.
- Golodne DM**, Van Heusden MC, Gondim KC, Masuda H, Atella GC (2001). Purification and characterization of a lipid transfer particle in *Rhodnius prolixus*: phospholipid transfer. *Insect Biochem Mol Biol.* 31(6-7): 563-71.

Gopalapillai R, Kadono-Okuda K, Tsuchida K, Yamamoto K, Nohata J, Ajimura M, Mita K (2006). Lipophorin receptor of *Bombyx mori*: cDNA cloning, genomic structure, alternate splicing, and isolation of a new isoform. *J Lipid Res.* 47: 1005–1013.

Graham P and Pick L (2017). *Drosophila* as a model for diabetes and diseases of insuline resistance. *Curr Top Dev Biol.* 121: 397-419.

Grieneisen ML (1994). Recent advances in our knowledge of ecdysteroid biosynthesis in insects and crustaceans. *Insect Biochem Mol Biol.* 24: 115-132.

Grönke S, Mildner A, Fellert S, Tennagels N, Petry S, Müller G, Jäckle H and Kühnlein RP (2005). Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metab.* 1(5): 323-30.

Grigliatti TA, Hall L, Rosenbluth R, Suzuki DT (1973). Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. XIV. A selection of immobile adults. *Mol Gen Genet.* 120(2): 107-14.

Gu HM, Adijiang A, Mah M, Zhang DW (2013). Characterization of the role of EGF-A of low density lipoprotein receptor in PCSK9 binding. *J Lipid Res.* 54(12): 3345-57.

Gu X, Quilici D, Juarez P, Blomquist GJ and Schal C (1995). Biosynthesis of hydrocarbons and contact sex pheromone and their transport by lipophorin in females of the German cockroach (*Blattella germanica*). *J insect Physiol.* 41(3): 257-267.

Guidugli-Lazzarini KR, do Nascimento AM, Tanaka ED, Piulachs MD, Hartfelder K, Bitondi MG, Simões ZL (2008). Expression analysis of putative vitellogenin and lipophorin receptors in honey bee (*Apis mellifera* L.) queens and workers. *J Insect Physiol.* 54(7): 1138-47.

Guo Y, Walther TC, Rao M, Stuurman N, Goshima G, Terayama K, Wong JS, Vale RD, Walter P, Farese RV (2008). Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature.* 453(7195): 657-61.

Guttman M and Komives EA (2011). The structure, dynamics, and binding of the LA45 module pair of the low-density lipoprotein receptor suggest an important role for LA4 in ligand release. *Biochemistry.* 50(51): 11001-8.

Häder T, Müller S, Aguilera M, Eulenberg KG, Steuernagel A, Clossek T, Kühnlein RP, Lemaire L, Fritsch R, Dohrmann C, Vetter IR, Jäckle H, Doane WW and Brönner G (2003). Control of triglyceride storage by a WD40/TPR-domain protein. *EMBO Rep.* 4(5): 511-6.

Hailman E, Albers JJ, Wolfbauer G, Tu AY, Wright SD (1996). Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem.* 271(21): 12172-8.

Hardy CM, Birse RT, Wolf MJ, Yu L, Bodmer R and Gibbs AG (2015). Obesity-associated cardiac dysfunction in starvation-selected *Drosophila melanogaster*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 309(6): R658-67.

Hegde RS and Bernstein HD (2006). The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem Sci.* 31(10): 563-71.

- Herz J** and Bock HH (2002). Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu Rev Biochem.* 71: 405–34.
- Hesler CB**, Swenson TL, Tall AR (1987). Purification and characterization of a human plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Biol Chem.* 262(5): 2275-82.
- Hiesberger T**, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J (1999). Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron.* 24(2): 481-9.
- Higuchi R**, Krummel B, and Saiki RK(1988) A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 16(15): 7351-7367.
- Hiller K**, Grote A, Scheer M, Münch R, and Jahn D (2004). PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions. *Nucleic Acids Res.* 1:32 (Web Server issue): W375-9.
- Hirabayashi S** (2016). The interplay between obesity and cancer: a fly view. *Dis Model Mech.* 9(9): 917-26.
- Hirayama Y** and Chino H (1990). Lipid transfer particle in locust hemolymph: purification and characterization. *J Lipid Res.* 31(5): 793-9.
- Hiss JA** and Schneider G (2009). Architecture, function and prediction of long signal peptides. *Brief Bioinform.* 10(5): 569-78.
- Hjälml G**, Murray E, Crumley G, Harazim W, Lundgren S, Onyango I, Ek B, Larsson M, Juhlin C, Hellman P, Davis H, Akerström G, Rask L, Morse B (1996). Cloning and sequencing of human gp330, a Ca(2+)-binding receptor with potential intracellular signaling properties. *Eur J Biochem.* 239(1): 132-7.
- Hobbs HH**, Brown MS and Goldstein JL (1992) Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1(6):445-66.
- Hoe HS**, Wessner D, Beffert U, Becker AG, Matsuoka Y, Rebeck GW (2005) F-spondin interaction with the apolipoprotein E receptor ApoEr2 affects processing of amyloid precursor protein. *Mol Cell Biol.* 25(21): 9259-68.
- Hopp TP**, Prickett KS, Price VL, Libby RT, March CJ, Cerretti DP, Urdal DL and Conlon PJ (1988). A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Nat Biotech.* 6: 1204-1210.
- Howell BW**, Lanier LM, Frank R, Gertler FB and Cooper JA (1999). The Disabled 1 phosphotyrosine-binding domain binds to the internalization signals of transmembrane glycoproteins and to phospholipids. *Mol Cell Biol.* 19(7): 5179-5188.
- Huber LA**, Pimplikar S, Parton RG, Virta H, Zerial M, Simons K (1993). Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *J Cell Biol.* 123(1): 35-45.

Iijima H, Miyazawa M, Sakai J, Magoori K, Ito MR, Suzuki H, Nose M, Kawarabayasi Y and Yamamoto TT (1998). Expression and characterization of a very low density lipoprotein receptor variant lacking the O-linked sugar region generated by alternative splicing. *J. Biochem.* 124: 747–755.

Inazu A, Koizumi J, Mabuchi H (1996). Cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency and increased HDL cholesterol levels (hyperalphalipoproteinemia). *Rinsho Byori.* 44(4): 322-6.

Innerarity TL (2002). Structural biology. LDL receptor's beta-propeller displaces LDL. *Science.* 298: 2337-2339.

Jeon H and Blacklow SC (2003). An intramolecular spin of the LDL receptor beta propeller. *Structure.* 11(2): 133-6.

Jeon H and Blacklow SC (2005). Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem.* 74: 535-62.

Jiang XC, Bruce C, Mar J, Lin M, Ji Y,1. Francone OL, and Tall (1999). Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J Clin Invest.* 103(6): 907-914.

Jiang XC, Tall AR, Qin S, Lin M, Schneider M, Lalanne F, Deckert V, Desrumaux C, Athias A, Witztum JL, Lagrost L (2002). Phospholipid transfer protein deficiency protects circulating lipoproteins from oxidation due to the enhanced accumulation of vitamin E. *J Biol Chem.* 277(35): 31850-6.

Jouni ZE, Yun HK, Wells MA (2002). Cholesterol efflux from larval *Manduca sexta* fat body in vitro: high-density lipophorin as the acceptor. *J Insect Physiol.* 48(6): 609-618.

Jouni ZE, Takada N, Gazard J, Maekawa H, Wells MA, Tsuchida K (2003). Transfer of cholesterol and diacylglycerol from lipophorin to *Bombyx mori* ovarioles in vitro: role of the lipid transfer particle. *Insect Biochim Acta.* 33(2): 145-53.

Kapp K, Schrempf S, Lemberg MK, Dobberstein B (2009). Post-targeting functions of signal peptides. In: Zimmermann, R. (Ed.), *Protein Transport into the Endoplasmic Reticulum*. Landes Bioscience, Austin.

Khaliullina H, Panáková D, Eugster C, Riedel F, Carvalho M, Eaton S (2009). *Development.* 136(24): 4111-21.

Kikuchi A, Yamamoto H and Kishida S (2007). Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell Signal.* 19(4): 659- 71.

Kilic A, Klose S, Dobberstein B, Knust E, Kapp K (2010). The *Drosophila* Crumbs signal peptide is unusually long and is a substrate for signal peptide peptidase. *Eur J Cell Biol.* 89(6): 449-61.

Kim SJ, Mitra D, Salermo JR, Hegde R (2002). Signal Sequences Control Gating of the Protein Translocation Channel in a Substrate-Specific Manner. *Dev Cell.* 2(2): 207-217.

- Kingsley** DM, Kozarsky KF, Hobbie L, Krieger M (1986). Reversible defects in O-linked glycosylation and LDL receptor expression in a UDP-Gal/UDP-GalNAc 4-epimerase deficient mutant. *Cell*. 44: 749–759.
- Koivisto** UM, Hubbard AL and Mellman I (2001). A novel cellular phenotype for familial hypercholesterolemia due to a defect in polarized targeting of LDL receptor. *Cell*. 105(5): 575-85.
- Korschineck** I, Ziegler S, Breuss J, Lang I, Lorenz M, Kaun C, Ambros PF, Binder BR (2001). Identification of a novel exon in apolipoprotein E receptor 2 leading to alternatively spliced mRNAs found in cells of the vascular wall but not in neuronal tissue. *J Biol Chem*. 276(16): 13192-7.
- Kurasawa** JH, Shestopal SA, Karnaukhova E, Struble EB, Lee TK, Sarafanov AG (2013). Mapping the binding region on the low density lipoprotein receptor for blood coagulation factor VIII. *J Biol Chem*. 288(30): 22033-41.
- Kurys** G, Tagaya Y, Bamford R, Hanover JA, Waldmann TA (2000). The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15. *J Biol Chem*. 275(39): 30653-9.
- Lai** CQ, Parnell LD, Arnett DK, García-Ballo B, Tsai MY, Kabagambe EK, Straka RJ, Province MA, An P, Borecki IB, Tucker KL and Ordovás JM (2009). WDTTC1, the ortholog of *Drosophila* adipose gene, associates with human obesity, modulated by MUFA intake. *Obesity*. 17(3): 593-600.
- Lakomá** J, Garcia-Alonso L, Luque J. M. (2011). Reelin sets the pace of neocortical neurogenesis. *Development*. 138: 5223–5234.
- Lalazar** A, Weisgraber KH, Rall SC Jr, Giladi H, Innerarity TL, Levanon AZ, Boyles JK, Amit B, Gorecki M, Mahley RW, et al. (1988). Site-specific mutagenesis of human apolipoprotein E. Receptor binding activity of variants with single amino acid substitutions. *J Biol Chem*. 263(8): 3542-5.
- Law** JH, Ribeiro JM, Wells MA (1992). Biochemical insights derived from insect diversity. *Annu Rev Biochem*. 61: 87-111.
- Lee** CS, Han JH, Kim BS, Lee SM, Hwang JS, Kang SW, Lee BH, Kim HR (2003a). Wax moth, *Galleria mellonella*, high density lipophorin receptor: alternative splicing, tissue-specific expression, and developmental regulation. *Insect Biochem Mol Biol*. 33: 761–771.
- Lee** CS, Han JH, Lee SM, Hwang JS, Kang SW, Lee BH, Kim HR (2003b). Wax moth, *Galleria mellonella* fat body receptor for high-density lipophorin (HDLp). *Arch Insect Biochem Physiol*. 54(1):14-24.
- Lemberg** MK and Martoglio B (2002). Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis. *Mol Cell*. 10(4): 735-44.

Li W and **Baker NE** (2007). Engulfment is required for cell competition. *Cell*. 129(6): 1215-25.
Liu H and **Ryan RO** (2001). Role of lipid transfer particle in transformation of lipophorin in insect oocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1085(1): 112-8.

Lloyd TE, **Atkinson R**, **Wu MN**, **Zhou Y**, **Pennetta G**, **Bellen HJ** (2002). Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in *Drosophila*. *Cell*. 108(2): 261-9.

Lue NF, **Chasman DI**, **Buchman AR**, **Kornberg RD** (1987). Interaction of GAL4 and GAL80 gene regulatory proteins in vitro. *Mol Cell Biol*. 7(10): 3446-51.

Magrané J, **Casaroli-Marano RP**, **Reina M**, **Gåfväls M** and **Vilaró S** (1999). The role of O-linked sugars in determining the very low density lipoprotein receptor stability or release from the cell. *FEBS Lett*. 451(1): 56-62.

Makki R, **Cinnamon E** and **Gould AP** (2014). The development and functions of oenocytes. *Annu Rev Entomol*. 59: 405-25.

Mann CJ, **Anderson TA**, **Read J**, **Chester SA**, **Harrison GB**, **Köchl S**, **Ritchie PJ**, **Bradbury P**, **Hussain FS**, **Amey J**, **Vanloo B**, **Rosseneu M**, **Infante R**, **Hancock JM**, **Levitt DG**, **Banaszak LJ**, **Scott J**, **Shoulders CC** (1999). The structure of vitellogenin provides a molecular model for the assembly and secretion of atherogenic lipoproteins. *J Mol Biol*. 285(1): 391-408.

Martensen PM, **Oka K**, **Christensen L**, **Rettenberger PM**, **Petersen HH**, **Christensen A**, **Chan L**, **Heegaard CW** and **Andreasen PA** (1997). Breast carcinoma epithelial cells express a very low-density lipoprotein receptor variant lacking the O-linked glycosylation domain encoded by exon 16, but with full binding activity for serine proteinase/serpin complexes and Mr-40,000 receptor-associated protein. *Eur. J. Biochem*. 248: 583-591.

Martínez-Oliván J, **Rozado-Aguirre Z**, **Arias-Moreno X**, **Angarica VE**, **Velázquez-Campoy A**, **Sancho J** (2014). Low-density lipoprotein receptor is a calcium/magnesium sensor - role of LR4 and LR5 ion interaction kinetics in low-density lipoprotein release in the endosome. *FEBS J*. 281(11): 2638-58.

Martoglio B, **Graf R**, **Dobberstein B** (1997). Signal peptide fragments of preprolactin and HIV-1 p-gp160 interact with calmodulin. *Embo J*. 16:6636-45.

Martoglio B and **Dobberstein B** (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol*. 8(10): 410-5.

May P, **Reddy YK**, **Herz J** (2002). Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *J Biol Chem*. 277(21): 18736-43.

McGuire SE, **Le PT**, **Osborn AJ**, **Matsumoto K**, **Davis RL** (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science*. 302(5651): 1756-8.

Meier P, **Silke J**, **Leevers SJ**, **Evan GI** (2000). The *Drosophila* caspase DRONC is regulated by DIAP1. *EMBO J*. 19(4): 598-611.

- Michalides** R, Wagenaar E, Hilkens J, Hilgers J, Groner B, Hynes NE (1982). Acquisition of proviral DNA of mouse mammary tumor virus in thymic leukemia cells from GR mice. *J Virol.* 43(3): 819-29.
- Moriishi** K (2017). The potential of signal peptide peptidase as a therapeutic target for hepatitis C. *Expert Opin Ther Targets.* 21(9): 827-836.
- Morrow** JA, Segall ML, Lund-Katz S, Phillips MC, Knapp M, Rupp B, Weisgraber KH (2000). Differences in stability among the human apolipoprotein E isoforms determined by the amino-terminal domain. *Biochemistry.* 39(38): 11657-66.
- Muqit** MM and Feany MB (2002). Modelling neurodegenerative diseases in *Drosophila*: a fruitful approach?. *Nature Rev Neurosci.* 3(3): 237-43.
- Musselman** LP, Fink JL, Narzinski K, Ramachandran PV, Hathiramani SS, Cagan RL and Baranski TJ (2011). A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Dis Model Mech.* 4(6): 842-9.
- Na** J, Musselman LP, Pendse J, Baranski TJ, Bodmer R, Ocorr K and Cagan R (2013). A *Drosophila* model of high sugar diet-induced cardiomyopathy. *PLoS Genet.* 9(1): e1003175.
- Nagel** AC, Maier D, Preiss A (2002). Green fluorescent protein as a convenient and versatile marker for studies on functional genomics in *Drosophila*. *Dev Genes Evol.* 212(2): 93-8.
- Nakamura** F, Tanaka M, Takahashi T, Kalb RG, and Strittmatter SM (1998). Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorinD/III-induced growth cone collapse. *Neuron* 21: 1093–1100.
- Nelson** RE, Fessler LI, Takagi Y, Blumberg B, Keene DR, Olson PF, Parker CG, Fessler JH (1994). Peroxidase: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *EMBO J.* 13(15): 3438-47.
- Nordestgaard** BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A (2007). Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 298(3): 299-308.
- Ochman** H, Gerber AS, Hartl DL (1988). Genetic Applications of an Inverse Polymerase Chain Reaction. *Genetics.* 120(3): 621-3.
- Oldham** S (2011). Obesity and nutrient sensing TOR pathway in flies and vertebrates: Functional conservation of genetic mechanisms. *Trends Endocrinol Metab.* 22(2): 45-52.
- Ott** CM and Lingappa VR (2004) Signal sequences influence membrane integration of the prion protein. *Biochemistry.* 43: 11973–11982.
- Owusu.Ansah** E and Perrimon N (2014). Modeling metabolic homeostasis and nutrient sensing in *Drosophila*: implications for aging and metabolic diseases. *Dis Model Mech.* 7(3): 343-50.

Palm W, Sampaio JL, Brankatschk M, Carvalho M, Mahmoud A, Shevchenko A, Eaton S (2012). Lipoproteins in *Drosophila melanogaster*-assembly, function, and influence on tissue lipid composition. *PLoS Genet.* 8(7): e1002828.

Panáková D, Sprong H, Marois E, Thiele C, Eaton S (2005). Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature.* 435(7038): 58-65.

Parra-Peralbo E and Culi J (2011). *Drosophila* Lipophorin Receptors Mediate the Uptake of Neutral Lipids in Oocytes and Imaginal Disc Cells by an Endocytosis-Independent Mechanism. *PLoS Genet.* 7(2): e1001297.

Pasco MY and Léopold P (2012). High sugar-induced insulin resistance in *Drosophila* relies on the lipocalin Neural Lazarillo. *PLoS One.* 7(5): e36583.

Pearse BM, Smith CJ, Owen DJ (2000). Clathrin coat construction in endocytosis. *Curr Opin Struct Biol.* 10(2):220–228.

Pocha SM and Knust E (2013). Complexities of Crumbs function and regulation in tissue morphogenesis. *Curr Biol.* 23(7): R289-93.

Pospisilik JA, Schramek D, Schneidar H, Cronin SJ, Nehme NT, Zhang X, Knauf C, Cani PD, Aumayr K, Todoric J, Bayer M, Hashemi A, Puvion-Randall V, Tar K, Orthofer M, Neely GG, Dietzl G, Manoukian A, Funovics M, Prager G, Wagner O, Ferrandon D, Aberger F, Hui CC, Esterbauer H and Penninger JM (2010) *Drosophila* genome-wide obesity screen reveals hedgehog as a determinant of brown versus white adipose cell fate. *Cell* 140(1):148-60.

Pulipparacharuvil S, Akbar MA, Ray S, Sevrioukov EA, Haberman AS, Rohrer J, Krämer H (2005). *Drosophila* Vps16A is required for trafficking to lysosomes and biogenesis of pigment granules. *J Cell Sci.* 118: 3663–3673.

Racevskis J and Sarkar NH (1982). ML antigen of DBA/2 mouse leukemias: expression of an endogenous murine mammary tumor virus. *J Virol.* 42(3): 804-13.

Raiborg C, Bremnes B, Mehlum A, Gillooly DJ, D'Arrigo A, Stang E, Stenmark H (2001). FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J Cell Sci.* 114(Pt 12): 2255-63.

Ranaivoson FM, von Daake S, Comoletti D (2016). Structural Insights into Reelin Function: Present and Future. *Front Cell Neurosci.* 10:137.

Ravikumar G, Vardhana KV, Basavaraja HK (2011). Characterization of lipophorin receptor (LpR) mediating the binding of high density lipophorin (HDLp) in the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Sci.* 11:150.

Ren G, Rudenko G, Ludtke SJ, Deisenhofer J, Chiu W, Pownall HJ (2010). Model of human low-density lipoprotein and bound receptor based on CryoEM. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 107(3): 1059-64.

Rodenburg KW and Van der Horst DJ (2005). Lipoprotein-mediated lipid transport in insects: analogy to the mammalian lipid carrier system and novel concepts for the functioning of LDL receptor family members. *Biochim Biophys Acta*. 1736(1):10-29.

Rodríguez-Vázquez M, Vaquero D, Parra-Peralbo E, Mejía-Morales JE, Culi J (2015). Drosophila Lipophorin Receptors Recruit the Lipoprotein LTP to the Plasma Membrane to Mediate Lipid Uptake. *PLoS Genet*. 11(6): e1005356.

Roosendaal SD, Kerver J, Schipper M, Rodenburg KW, Van der Horst DJ (2008). The complex of the insect LDL receptor homolog, lipophorin receptor, LpR, and its lipoprotein ligand does not dissociate under endosomal conditions. *FEBS J*. 275(8): 1751-66.

Ruden DM, De Luca M, Garfinkel MD, Bynum KL and Lu X (2005). Drosophila nutrigenomics can provide clues to human gene-nutrient interactions. *Annu Rev Nutr*. 25: 499-522.

Rudenko G, Henry L, Henderson K, Ichtchenko K, Brown MS, Goldstein JL and Deisenhofer J (2002). Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science*. 298: 2353-2358.

Rulifson EJ, Kim SK and Nusse R (2002). Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science*. 296(5570): 1118-20.

Russell DW, Brown MS, Goldstein JL (1989). Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins. *J Biol Chem*. 264: 21682-21688.

Rusten TE, Lindmo K, Juhász G, Sass M, Seglen PO, Brech A, Stenmark H (2004). Programmed autophagy in the Drosophila fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev Cell*. 7(2): 179-92.

Ryan RO, Prasad SV, Henriksen EJ, Wells MA, Law JH (1986a). Lipoprotein interconversions in an insect, *Manduca sexta*. Evidence for a lipid transfer factor in the hemolymph. *J Biol Chem*. 261(2): 563-8.

Ryan RO, Wells MA, and Law JH (1986b). Lipid transfer protein from *Manduca sexta* hemolymph. *Biochem. Biophys Res Commun*. 136: 260-265.

Ryan RO, Senthilathipan KR, Wells MA, Law JH (1988a). Facilitated diacylglycerol exchange between insect hemolymph lipophorins. Properties of *Manduca sexta* lipid transfer particle. *J Biol Chem*. 263(28): 14140-5.

Ryan RO, Haunerland NH, Bowers WS, Law JH (1988b). Insect lipid transfer particle catalyzes diacylglycerol exchange between high-density and very-high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 962(1): 143-8.

Ryan RO (1990). Dynamics of insect lipophorin metabolism. *J. Lipid Res*. 31: 1725-1739.

Ryan RO, Howe A, Scraba DG (1990a). Studies of the morphology and structure of the plasma lipid transfer particle from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J Lipid Res*. 31(5): 871-9.

Ryan RO, Van Antwerpen R, Van der Horst DJ, Beenackers AM, Law JH (1990b). Manduca sexta lipid transfer particle acts upon a lipoprotein to catalyze lipid and apoprotein disproportionation. *J Biol Chem.* 265(1): 546-52.

Ryan RO, Wessler AN, Price HM, Ando S, Yokoyama S (1990c). Insect lipid transfer particle catalyzes bidirectional vectorial transfer of diacylglycerol from lipophorin to human low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 265(18): 10551-5.

Ryan RO, Yokoyama S, Liu H, Czarnecka H, Oikawa K, Kay CM (1992). Human apolipoprotein A-I liberated from high-density lipoprotein without denaturation. *Biochemistry.* 31(18): 4509-14.

Schal C, Sevala VL, Cardé RT (1998a). Novel and highly specific transport of a volatile sex pheromone by hemolymph lipophorin in moths. *Naturwissenschaften* 85: 339–342.

Schal C, Sevala VL, Young H, Bachmann JAS (1998b). Synthesis and transport of hydrocarbons: Cuticle and ovary as target tissues. *American Zoologist.*; 38: 382–393.

Schembri L, Dalibart R, Tomasello F, Legembre P, Ichas F, De Giorgi F (2007). The HA tag is cleaved and loses immunoreactivity during apoptosis. *Nat Methods.* 4(2): 107-7.

Schneider I, (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol.* 27(2): 353-65.

Schneider WJ and Nimpf J (2003). LDL receptor relatives at the crossroad of endocytosis and signaling. *Cell Mol Life Sci.* 60: 892–903

Schneider WJ, Kovanen PT, Brown MS, Goldstein JL, Utermann G, Weber W, Havel RJ, Kotite L, Kane JP, Innerarity TL, *et al.* (1981). Familial dysbetalipoproteinemia. Abnormal binding of mutant apoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits, and cows. *J Clin Invest.* 68(4): 1075–1085.

Schnörrer F, Kalchauer I, Dickson BJ (2007). The transmembrane protein Kon-tiki couples to Dgrip to mediate myotube targeting in *Drosophila*. *Dev Cell.* 12(5): 751-66. *Science.* 252(5014):1817-22.

Schrempp S, Froeschke M, Giroglou T. *et al.* (2007) Signal peptide requirements for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein C maturation and virus infectivity. *J Virol.* 81:12515–24.

Segrest JP, Jones MK, De Loof H and Dashti N (2001). Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res.* 42: 1346-1367.

Seo SJ, Cheon HM, Sun J, Sappington TW, Raikhel AS (2003). Tissue- and stage-specific expression of two lipophorin receptor variants with seven and eight ligand-binding repeats in the adult mosquito. *J Biol Chem.* 278(43): 41954-62.

Sepp KJ, Hong P, Lizarraga SB, Liu JS, Mejia LA, Walsh CA, Perrimon N (2008). Identification of neural outgrowth genes using genome-wide RNAi. *PLoS Genet.* 4(7): e1000111.

- Sevala** VL, Bachmann JAS and Schal C (1997). Lipophorin: a hemolymph juvenile hormone binding protein in the German cockroach, *Blattella germanica*. *Insect Biochem Mol Biol*. 27: 663–670.
- Shapiro** JP, Law JH and Wells MA (1988). Lipid Transport in insects. *Ann Rev Entomol*. 33: 297-318.
- Silver** J, Keerikatte V (1989). Novel Use of Polymerase Chain Reaction To Amplify Cellular DNA Adjacent to an Integrated Provirus. *J Virol*. 63(5): 1924-8.
- Simmons** T, Newhouse YM, Arnold, KS, Innerarity TL and Weisgraber KH (1997). Human low density lipoprotein receptor fragment. Successful refolding of a functionally active ligand-binding domain produced in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 272: 25531-25536.
- Singh** TK and Ryan RO (1991). Lipid transfer particle-catalyzed transfer of lipoprotein-associated diacylglycerol and long chain aliphatic hydrocarbons. *Arch Biochem Biophys*. 286(2): 376-82.
- Singh** TK, Scraba DG, Ryan RO (1992). Conversion of human low density lipoprotein into a very low density lipoprotein-like particle in vitro. 267(13): 9275-80.
- Smolenaars** MMW, de Morreé A, Kerver J, Van der Horst DJ and Rodenburg KW (2007). Insect lipoprotein biogenesis depends on an amphipathic b cluster in apolipophorin II/I and is stimulated by microsomal triglyceride transfer protein. *J Lipid Res*. 48: 1955-1965.
- Smolenaars** MMW, Kasperaitis MAM, Richardson PE, Rodenburg KW and Van der Horst DJ (2005). Biosynthesis and secretion of insect lipoprotein: involvement of furin in cleavage of the apoB homolog, apolipophorin-II/I. *J Lipid Res*. 46: 412-421.
- Sotillos** S, Díaz-Meco MT, Caminero E, Moscat J, Campuzano S (2004). DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol*. 166(4): 549-57.
- Soukup** SF, Culi J, Gubb D (2009). Uptake of the necrotic serpin in *Drosophila melanogaster* via the lipophorin receptor-1. *PLoS Genet*. 5(6): e1000532.
- Steinberg** D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl Med*. 320(14): 915-24.
- Strigini** M and Cohen SM (2000). Wingless gradient formation in the *Drosophila* wing. *Curr Biol*. 10(6): 293-300.
- Suh** JM, Zeve D, McKay R, Seo J, Salo Z, Li R, Wang M and Graff JM (2007). Adipose is a conserved dosage-sensitive antiobesity gene. *Cell Metab*. 6(3): 195-207.
- Sun** XM and Soutar AK (1999). Expression in vitro of alternatively spliced variants of the messenger RNA for human apolipoprotein E receptor-2 identified in human tissues by ribonuclease protection assays. *Eur J Biochem*. 262: 230-239.

Svoboda JA (1999). Variability of metabolism and function of sterols in insects. Crit Rev Biochem Mol Biol. 34(1): 49-57.

Tabata T (2001). Genetics of morphogen gradients. Nat Rev Genet. 2(8): 620-30.

Takeda T, Yamazaki H and Farquhar MG (2003). Identification of an apical sorting determinant in the cytoplasmic tail of megalin. Am J Physiol Cell Physiol. 284(5): C1105-13.

Takeuchi N and Chino H (1993). Lipid transfer particle in the hemolymph of the American cockroach: evidence for its capacity to transfer hydrocarbons between lipophorin particles. J Lipid Res. 34: 543-551.

Tanimoto H, Itoh S, ten Dijke P, Tabata T (2000). Hedgehog creates a gradient of DPP activity in Drosophila wing imaginal discs. Mol Cell. 5: 59-71.

Tennessen JM, Barry W, Cox J and Thummel CS (2014). Methods for studying metabolism in Drosophila. Methods. 68(1): 105-115.

Thaxton CS, Rink JS, Naha PC, Cormode DP (2016). Lipoproteins and lipoprotein mimetics for imaging and drug delivery. Adv Drug Deliv Rev. 106(Pt A): 116-131.

Triglia T, Peterson MG, and Kemp DJ (1988). A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. Nucleic Acids Res. 16(16): 8186.

Trinh I, Boulianne GL (2013). Modeling obesity and its associated disorders in Drosophila. Physiology. 28: 117-124.

Trommsdorff M, Borg JP, Margolis B, Herz J (1998). Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. J Biol Chem. 273(50): 33556-60.

Tsuchida K and Wells MA (1990). Isolation and characterization of a lipophorin receptor from the fat body of an insect, *Manduca sexta*. J Biol Chem. 265: 5761-5767.

Tsuchida K, Arai M, Tanaka Y, Ishihara R, Ryan RO, Maekawa H (1998). Lipid transfer particle catalyzes transfer of carotenoids between lipophorins of Bombyx mori. Insect Biochem Mol Biol. 28(12): 927-34.

Tsuchida K, Soulages JL, Moribayashi A, Suzuki K, Maekawa H, Wells MA (1997). Purification and properties of a lipid transfer particle from Bombyx mori, comparison to the lipid transfer particle from Manduca sexta. Biochim Biophys Acta. 1337: 57-65.

Tufail M and Takeda M (2008). Molecular characteristics of insect vitellogenins. J Insect Physiol. 54(12): 1447-58.

Tufail M and Takeda M (2009). Insect vitellogenin/lipophorin receptors: Molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. J Insect Physiol. 55: 87-103.

- Van Antwerpen** R, Linnemans WA, Van der Horst DJ, Beenackers AM (1988). Immunocytochemical localization of lipophorins in the flight muscles of the migratory locust (*Locusta migratoria*) at rest and during flight. *Cell Tissue Res.* 252(3): 661-8.
- Van der Horst** DJ (1990). Lipid transport function of lipoproteins in flying insects. *Biochim Biophys Acta.* 1047: 195-211.
- Van der Horst** DJ and Ryan RO (2004). Lipid transport. In *Comprehensive Molecular Insect Science*. Vol. 4. L. I. Gilbert, K. Iatrou, and S. S. Gill, editors. Elsevier, New York. 225–246.
- Van der Horst** DJ, Roosendaal SD, Rodenburg KW (2009). Circulatory lipid transport: lipoprotein assembly and function from an evolutionary perspective. *Mol Cell Biochem.* 326(1-2): 105-19.
- Van Heusden** MC and Law JH (1989). An insect lipid transfer particle promotes lipid loading from fat body to lipoprotein. *J Biol Chem.* 264(29): 17287-92.
- Van Heusden** MC, Van der Horst DJ, Kawooya JK, Law JH (1991). In vivo and in vitro loading of lipid by artificially lipid-depleted lipophorins: evidence for the role of lipophorin as a reusable lipid shuttle. *J Lipid Res.* 32(11): 1789-94.
- Van Heusden** MC, Yepiz-Plascencia GM, Walker AM, Law JH (1996). *Manduca sexta* lipid transfer particle: synthesis by fat body and occurrence in hemolymph. *Arch Insect Biochem Physiol.* 31(1): 39-51.
- Van Hoof** D, Rodenburg KW, Van der Horst DJ (2002). Insect lipoprotein follows a transferrin-like recycling pathway that is mediated by the insect LDL receptor homologue. *J Cell Sci.* 115(21): 4001-12.
- Van Hoof** D, Rodenburg KW, Van der Horst DJ (2003). Lipophorin receptor-mediated lipoprotein endocytosis in insect fat body cells. *J Lipid Res.* 44(8): 1431-40.
- Van Hoof** D, Rodenburg KW, Van der Horst DJ (2005). Receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking of lipoproteins and transferrin in insect cells. *Insect Biochem Mol Biol.* 35(2): 117-28.
- Varici** ND (2016). HDL abnormalities in nephrotic syndrome and chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 12(1): 37-47.
- Vidal** M and Cagan RL (2006.) *Drosophila* models for cancer research. *Curr Opin in Genet Dev.* 16(1): 10-16.
- Von Heijne** G (1984) How signal sequences maintain cleavage specificity. *J Mol Biol.* 173(2): 243-51.
- Walsh** MT and Atkinson D (1990). Calorimetric and spectroscopic investigation of the unfolding of human apolipoprotein B. *J Lipid Res.* 31(6): 1051-62.

- Walter P** and Johnson AE (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol.* 10: 87-119.
- Wang SL**, Hawkins CJ, Yoo SJ, Müller HA, Hay BA (1999). The Drosophila caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell.* 98(4): 453-63.
- Weisgraber KH**, Innerarity TL & Mahley RW (1982). Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem.* 257: 2518–2521.
- Willnow TE** (1999). The low-density lipoprotein receptor gene family: Multiple roles in lipid metabolism. *J. Mol Med.* 77: 306–315.
- Willnow TE**, Armstrong SA, Hammer RE, Herz J (1995). Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo. *Proc. Natl Acad Sci U.S.A.* 92: 4537-4541.
- Willnow TE**, Rohlmann A, Horton J, Otani H, Braun JR, Hammer RE, Herz J (1996). RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors. *EMBO J.* 15: 2632-2639.
- Wilson C**, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA (1991). Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E.
- Wucherpennig T**, Wilsch-Bräuninger M, González-Gaitán M (2003). Role of Drosophila Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked neurotransmitter release. *J Cell Biol.* 161(3): 609-24.
- Xu T** and Rubin GM (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. *Development.* 117: 1223–1237.
- Yamamoto T** and Ryan RO (2009). Domain swapping reveals that low density lipoprotein (LDL) type A repeat order affects ligand binding to the LDL receptor. *J Biol Chem.* 284(20): 13396-400.
- Yokode M**, Pathak RK, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL, Anderson RG (1992). Cytoplasmic sequence required for basolateral targeting of LDL receptor in livers of transgenic mice. *J Cell Biol.* 117(1): 39–46.
- Zaiou M**, Arnold KS, Newhouse YM, Innerarity TL, Weisgraber KH, Segall ML, Phillips MC, Lund-Katz S (2000). Apolipoprotein E₃-low density lipoprotein receptor interaction. Influences of basic residue and amphipathic alpha-helix organization in the ligand. *J Lipid Res.* 41(7): 1087-96.
- Zhang DW**, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH (2007). Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem.* 282(25): 18602-12.

Zhang X and Bremer H (1995). Control of the Escherichia coli rrnB P1 promoter strength by ppGpp. J Biol Chem. 270(19): 11181-9.

UAS, dps, eugly

Yub gueso's

~~sp 69~~

sp 69 / 5 r / gal 80's

sp 69

UAS-2E

gal 80's

UAS-2E, En
sacB ut

→

sp 69
sp 69
sp 69-2F

UAS-2E, En
sp 69

gal 80's

gal 80's

ANEXOS

RESEARCH ARTICLE

Drosophila Lipophorin Receptors Recruit the Lipoprotein LTP to the Plasma Membrane to Mediate Lipid Uptake

Miriam Rodríguez-Vázquez, David Vaquero[®], Esmeralda Parra-Peralbo[®], John E. Mejía-Morales, Joaquim Culi*

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CSIC-UPO-JA), Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain

© These authors contributed equally to this work.

* jculesp@upo.es



OPEN ACCESS

Citation: Rodríguez-Vázquez M, Vaquero D, Parra-Peralbo E, Mejía-Morales JE, Culi J (2015) *Drosophila* Lipophorin Receptors Recruit the Lipoprotein LTP to the Plasma Membrane to Mediate Lipid Uptake. PLoS Genet 11(6): e1005356. doi:10.1371/journal.pgen.1005356

Editor: Carl S. Thummel, University of Utah, UNITED STATES

Received: February 6, 2015

Accepted: June 12, 2015

Published: June 29, 2015

Copyright: © 2015 Rodríguez-Vázquez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was funded by a grant (BFU2011-29296) from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (www.idi.mineco.gob.es/) to JC. Centro Andaluz de Biología del Desarrollo is institutionally supported by CSIC, Universidad Pablo de Olavide, and Junta de Andalucía. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Lipophorin, the main *Drosophila* lipoprotein, circulates in the hemolymph transporting lipids between organs following routes that must adapt to changing physiological requirements. Lipophorin receptors expressed in developmentally dynamic patterns in tissues such as imaginal discs, oenocytes and ovaries control the timing and tissular distribution of lipid uptake. Using an affinity purification strategy, we identified a novel ligand for the lipophorin receptors, the circulating lipoprotein Lipid Transfer Particle (LTP). We show that specific isoforms of the lipophorin receptors mediate the extracellular accumulation of LTP in imaginal discs and ovaries. The interaction requires the LA-1 module in the lipophorin receptors and is strengthened by a contiguous region of 16 conserved amino acids. Lipophorin receptor variants that do not interact with LTP cannot mediate lipid uptake, revealing an essential role of LTP in the process. In addition, we show that lipophorin associates with the lipophorin receptors and with the extracellular matrix through weak interactions. However, during lipophorin receptor-mediated lipid uptake, LTP is required for a transient stabilization of lipophorin in the basolateral plasma membrane of imaginal disc cells. Together, our data suggests a molecular mechanism by which the lipophorin receptors tether LTP to the plasma membrane in lipid acceptor tissues. LTP would interact with lipophorin particles adsorbed to the extracellular matrix and with the plasma membrane, catalyzing the exchange of lipids between them.

Author Summary

In multicellular animals, nutrients and metabolites required for cell growth are distributed throughout the body by the blood circulation or in insects, by hemolymph. The uptake of these molecules by cells is tightly controlled to ensure the necessary coordination between cellular requirements and organismal homeostasis. Here we examine the mechanisms that mediate the cellular uptake of lipids in *Drosophila melanogaster*, a model organisms increasingly used in studies of metabolic homeostasis and its intersection with growth,

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

aging and disease. In *Drosophila*, the majority of hemolymph lipids are carried in a lipoprotein particle named lipophorin. Lipid uptake in organs such as the ovaries or the imaginal discs is initiated by the expression of receptors of the LDLR family in the cell membrane. We show that these receptors bind with high affinity to a circulating lipoprotein named LTP, recruiting it to the cell surface. Surprisingly, LTP is not a major lipid carrier but instead catalyzes the transfer of lipids from lipophorin to cells. Our results improve our understanding of a central aspect of lipid metabolism in *Drosophila* and illustrate that although homologous proteins of the LDLR family play central roles in lipid uptake across phyla, the specific molecular mechanisms involved are diverse.

Introduction

Lipids are continuously trafficked between tissues, from sites of absorption and synthesis to the organs that will utilize them. These transport routes must adapt to the changing metabolic status and developmental stage of the animal. Thus, during the feeding period of *Drosophila* larvae, a main pathway of lipid transport originates at the gut and delivers lipids to the fat body for storage. Imaginal discs also accumulate considerable amounts of neutral lipids during this stage. In contrast, under starvation and during the non-feeding pupal stage, lipids are mobilized from the fat body to support organismal growth and metabolism. Other main transport routes carry neutral lipids derived from the fat body to the muscles during flight and, in adult females, large amounts of lipids are also transferred to vitellogenic oocytes as an essential energy reserve [1–4]. How these routes are regulated and how lipids are targeted to particular tissues at specific developmental times is not well understood.

In insects, lipids are transported in hemolymph as lipoprotein particles, the most abundant being lipophorin, which carries about 95% of all hemolymph lipids in *Drosophila* [1,4]. Each particle contains a single copy of Apolipophorin I and Apolipophorin II, derived from the cleavage of a common precursor with homology to mammalian ApoB [5] and multiple lipid species, predominantly diacylglycerol (DAG) and phospholipids. Circulating lipophorin comes in contact with all tissues and cells, allowing for the potential exchange of lipids. Unfortunately, the mechanisms that mediate and regulate this exchange are only partially understood. Classic experiments demonstrated that lipophorin operates by a shuttle mechanism. Apolipophorin has a long half-life, calculated to exceed one day in some species [6], and each particle participates in multiple cycles of lipid loading and unloading in tissues without apparent degradation of the Apolipophorin moiety [7]. Biochemical and kinetic studies indicated that the interaction of lipophorin with cells is mediated through specific receptors [8–11]. At the molecular level, the best characterized are the lipophorin receptors of the Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) family, which were initially identified by their capacity to induce lipophorin endocytosis when overexpressed in a cell culture system [12]. In *Drosophila*, *lipophorin receptor 1* and 2 (*lpr1* and *lpr2*) are required for the uptake of neutral lipids in imaginal discs, oocytes and oenocytes [13,14]. However, *lpr1*, *lpr2* double mutant animals are viable and do not display significant changes in total neutral lipid content, suggesting that the major routes for lipid transport are not grossly disrupted. *Drosophila* lipophorin receptors promote lipid uptake by an endocytosis independent mechanism still poorly characterized [13]. Interestingly, these genes generate multiple, functionally diverse isoforms. Those containing a specific LDLR class A (LA) domain mediate neutral lipids uptake whereas the involvement of the remaining isoforms in lipid metabolism is unclear [13].

In insects, the exchange of lipids between lipophorin and tissues was shown to be facilitated by a circulating, low abundance, high density lipoprotein named Lipid Transfer Particle (LTP). Early in vitro studies showed that LTP had a surprising catalytic activity. It promoted the exchange of lipids, mostly DAG, between lipophorin particles of different densities and even between human LDL and insect lipophorins [15]. Additional experiments demonstrated that LTP also promoted the transfer of lipids between explanted tissues and purified lipophorin in vitro. In particular, transfer of lipids from the midgut to lipophorin and from lipophorin to the fat body and to ovaries was shown to be blocked by an anti-LTP antibody and resumed by the addition of purified LTP [16–19]. More recently, the genes coding for *apoLTP* in *Drosophila* and in *Bombyx mori* were identified and novel mutations isolated [4,20]. One of the most prominent phenotypes of *apoLTP* loss of function in *Drosophila* is the accumulation of neutral lipids in the gut, a phenotype similar to *apolipophorin* silencing [21] that demonstrates the essential role of LTP for loading lipophorin with lipids in enterocytes [4].

Here, we examine the molecular mechanisms that mediate the transfer of neutral lipids from lipophorin to imaginal discs and to ovaries. We identified LTP as a novel lipophorin receptor ligand. Our results indicate that recruitment of LTP to cell membranes mediated by the lipophorin receptors is a key event that initiates the transfer of neutral lipids to cells.

Results

LTP is a ligand for a subset of lipophorin receptor isoforms

To improve our understanding of the molecular mechanisms involved in lipophorin receptor-mediated lipid uptake, we decided to search for lipophorin receptor interacting proteins that could potentially participate in the process. To this end, we used an affinity purification strategy. We selected isoforms Lpr2E and Lpr2F as baits. Lpr2E mediates lipid uptake in imaginal discs and ovaries whereas Lpr2F, despite being 95.5% identical to Lpr2E, is inactive in this regard and was used as a negative control [13]. Both isoforms were tagged with TAP at the C-termini to facilitate purification [22], overexpressed in ovaries, a tissue of high lipid uptake activity, and affinity purified from ovary extracts. Proteins that differentially co-purified with Lpr2E compared to the control Lpr2F were identified by mass spectrometry (S1 Fig). To increase the probability to find interactors, we performed a second affinity purification experiment using Lpr2E and Lpr2F extracellular domains as baits instead of full-length proteins. In this experiment, we directed expression of the secretable baits to the fat body and purified the proteins from total larval extracts. Notably, in both experiments we identified the circulating lipoprotein LTP as a main Lpr2E interactor. In contrast, LTP was not isolated when Lpr2F was used as bait, either in the full-length or in the secretable form (S1 Fig).

To validate the previous results, we examined the physical interaction between LTP and the lipophorin receptor isoforms by co-IP. HA tagged Lpr2E and Lpr2F isoforms were expressed and purified from *Drosophila* S2 cells and incubated in vitro with diluted hemolymph from wild type larvae. Hemolymph LTP strongly bound to Lpr2E, generating a robust signal, whereas it did not co-immunoprecipitate with Lpr2F (Fig 1A). Thus, these results confirm that LTP is a ligand of lipid uptake-promoting Lpr2E isoform but not of lipid uptake-inactive Lpr2F isoform and suggest that LTP might be a factor specifically involved in the transfer of lipids from lipophorin to tissues. Surprisingly, under the same conditions we were unable to detect an interaction between the lipophorin receptors and lipophorin (Fig 1A), even though lipophorin is more abundant than LTP in hemolymph. Thus, the affinity of lipophorin for the lipophorin receptors is weaker than that of LTP. Moreover, this result indicates that LTP binding to Lpr2E does not require lipophorin.

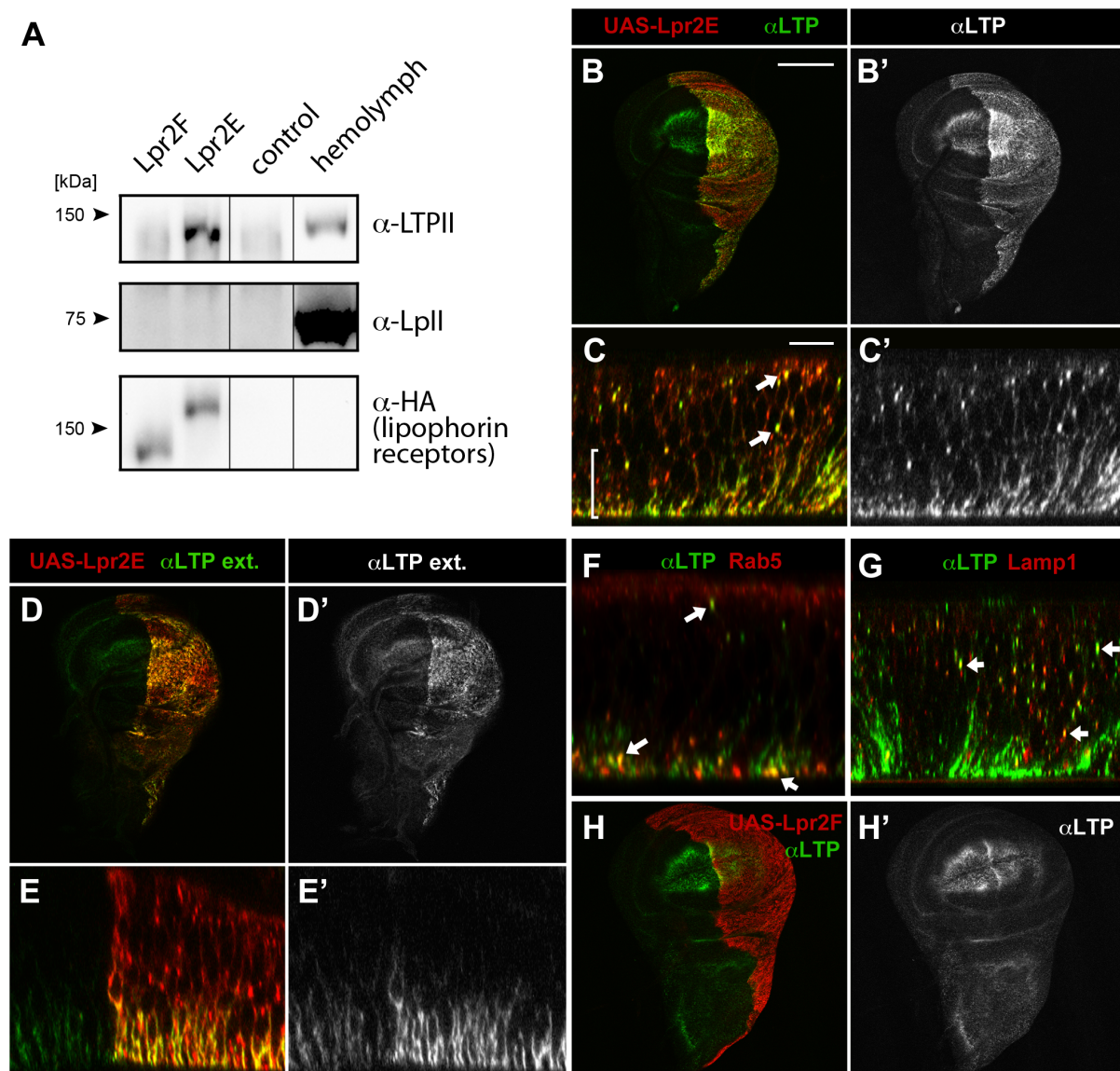


Fig 1. LTP is a ligand for a subset of lipophorin receptor isoforms. (A) Co-IP of LTP (top) and lipophorin (middle) with Lpr2F, Lpr2E or empty beads (control), analyzed by western blot. Lpr2E and Lpr2F, both containing an HA tag, were purified from transfected *Drosophila* S2 cells, incubated with diluted hemolymph and immunoprecipitated with anti-HA. Eluates were analyzed for the presence of lipophorin receptors, shown in the lower panel, of LTP, in the upper panel and of lipophorin, in the middle panel. Last lane contains 0.13 μ l of diluted hemolymph. (B-E) Wing imaginal discs expressing *UAS-lpr2E* (red, detected with α -HA) in the posterior compartment driven by *hh-gal4*. Optical sections through the basal domain of imaginal discs (B and D) and cross-sections (C and E, apical domain at the top) are shown. LTP (green, also shown in a separate channel) accumulates at higher levels in the posterior compartment where Lpr2E is overexpressed (B and B'). In this region, LTP is detected at higher levels in basolateral membranes (bracket) as well as in vesicles (arrows), colocalizing with Lpr2E (C and C'). An immunostaining technique that solely detects extracellular proteins showed LTP (green, also in a separate channel) in basolateral membranes through the wing pouch area and at higher levels in the posterior compartment, where Lpr2E was overexpressed (D, D', E and E'). (F and G) Wing imaginal discs expressing *UAS-lpr2E* and *UAS-rab5-GFP* (F) or *UAS-lamp1-GFP* (G), shown in cross-section through the wing pouch area. LTP (green) is found in endocytic vesicles (arrows) partially colocalizing with Rab5 (red, F) and Lamp1 (red, G). (H) Wing imaginal disc expressing *UAS-lpr2F* (red) in the posterior compartment driven by *hh-gal4*. LTP distribution (green, also in a separate channel) imaged at a basal plane, is not modified by Lpr2F overexpression. B, D and H shown at the same magnification. Scale bar: 200 μ m. C, E, F and G at the same magnification. Scale bar: 10 μ m.

doi:10.1371/journal.pgen.1005356.g001

Lipophorin receptors mediate LTP accumulation in ovaries and imaginal discs

Our *in vitro* data indicated Lpr2E binds with high affinity to LTP. To examine the functional relevance of this interaction, we first tested whether Lpr2E can promote LTP endocytosis or affect LTP distribution *in vivo* in imaginal discs, a tissue where lipophorin receptors activity was well characterized [13]. Interestingly, we found *UAS-lpr2E* overexpression induced a strong accumulation of LTP in basolateral cell membranes as well as formation of intracellular particles suggestive of LTP endocytosis (Fig 1B and 1C). These particles showed partial colocalization with the early endosome marker Rab5 and the lysosomal marker Lamp1, indicating that they represent different stages of LTP endocytosis (Fig 1F and 1G). The accumulation of LTP at the basolateral domain was mostly extracellular, since it could be detected with an immunostaining protocol performed without cell permeabilization (Fig 1D and 1E). Of notice, no such LTP accumulation or endocytosis was detected after Lpr2F overexpression (Fig 1H). Thus, isoform Lpr2E interacts *in vivo* with LTP and can promote LTP extracellular accumulation and endocytosis when overexpressed. The interaction is isoform-specific *in vivo*, as was already suggested by our *in vitro* data. In contrast, similar experiments indicated that overexpression of *UAS-lpr2E* or of *UAS-lpr2F*, both induced the endocytosis of lipophorin in imaginal discs, as shown by the formation of lipophorin intracellular vesicles that partially co-localized with endosome markers ([23] and S2 Fig). Thus, lipophorin receptor isoforms can induce lipophorin endocytosis irrespectively of their capacity to mediate lipid uptake.

The lipophorin receptors are expressed in adult ovaries and in larval imaginal discs where they are required for neutral lipid uptake [13]. Thus, we examined whether LTP distribution in these tissues was altered in lipophorin receptor mutants. We found that in wild type ovaries, LTP accumulated in nurse cells plasma membranes starting at stage 9 follicles and strongly increasing at stage 10 (Fig 2A), essentially coinciding with *lpr2* expression pattern [13]. Interestingly, this accumulation mostly disappeared when *lpr2* was eliminated in *Df(3R)lpr2* or in *Df(3R)lpr1/2* females, which removes *lpr1* and *lpr2* genes (Fig 2B and 2C). In both mutants, occasional patches of LTP remained, mostly in crevices between nurse cells. Thus, *lpr2* is essential for LTP accumulation in nurse cells plasma membrane.

In wild type wing imaginal discs LTP is mostly found in the wing pouch region, accumulating in basolateral cell membranes as well as in a few apical vesicles (Fig 2D and inset). The wing pouch area expresses *lpr1* and *lpr2* and thus, these receptors could potentially mediate the observed LTP distribution. Accordingly, no LTP is detectable in imaginal discs from *lpr1*, *lpr2* double mutant larvae (Fig 2E). Taken together, our data demonstrates that both, in ovarian follicles and in imaginal discs cells, the lipophorin receptors are required for the accumulation of LTP at the cell surface. In addition, they mediate LTP endocytosis in imaginal discs.

We detected LTP in additional larval tissues. In particular, we saw a strong signal in gastric caeca and in discrete regions of the midgut (S3 Fig and [4]), the ring gland, the oenocytes, the salivary gland imaginal rings and a weaker staining in the fat body (S3 Fig). LTP distribution in these tissues did not change or slightly decreased in *Df(3R)lpr1/2* larvae (S3 Fig), suggesting the existence of other, still unidentified, LTP receptors.

LTP is required for the accumulation neutral lipids in ovarian follicles and imaginal discs

The specific interaction between LTP and the lipophorin receptor isoforms that mediate lipid uptake suggests that LTP is involved in this process. To examine this possibility, we generated a novel mutation in *apoLTP* by the imprecise excision of the artificial transposon *P{wHy}* *DG06206*, inserted close to *apoLTP* promoter (S4 Fig). The excision removed a 4.8 Kb fragment

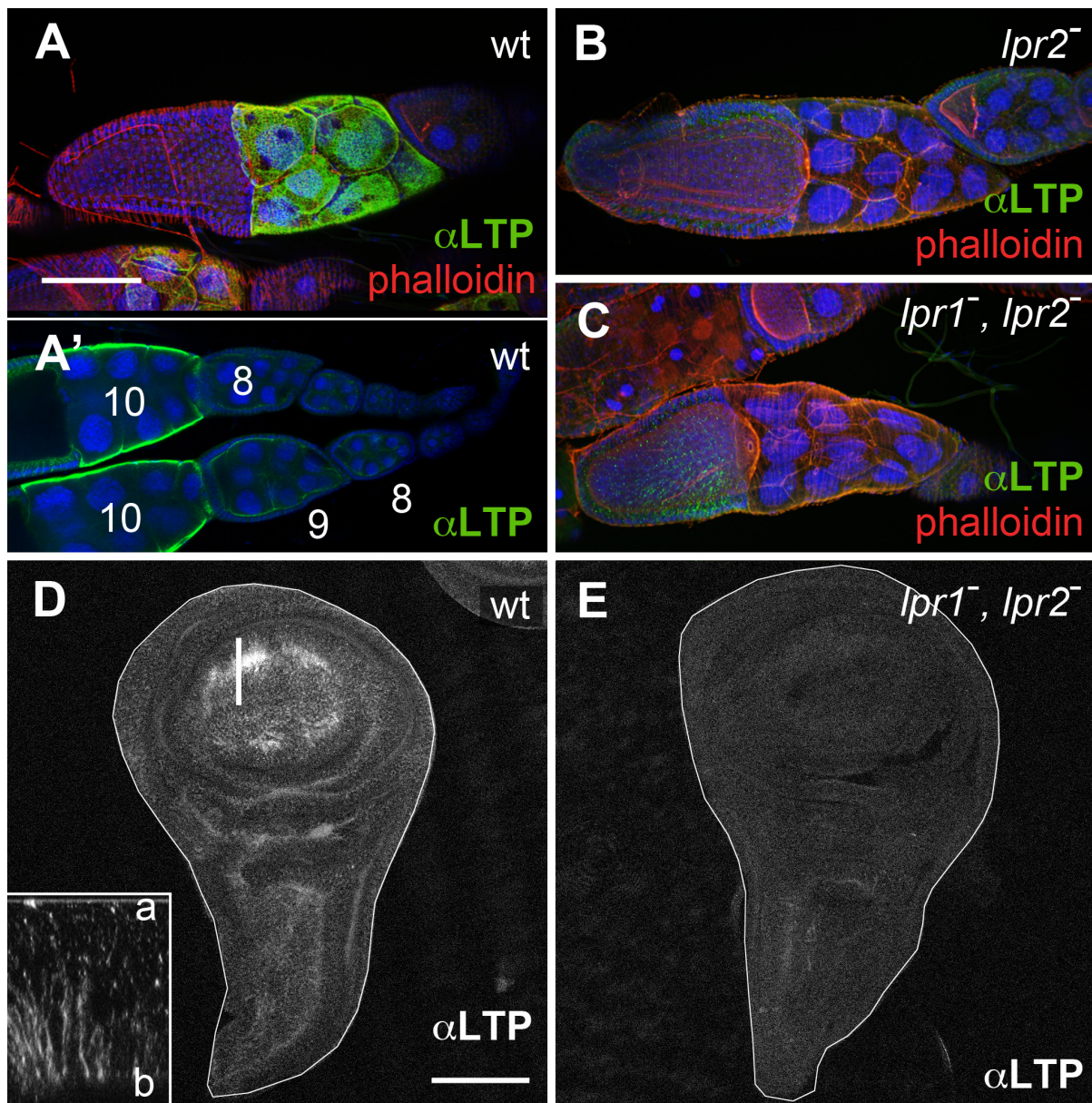


Fig 2. The lipophorin receptors are required for LTP accumulation in ovaries and imaginal discs. (A-C) Egg chambers of wild type (A), *Df(3R)lpr2* (B) and *Df(3R)lpr1/2* (C) genotypes, showing LTP distribution (green), F-actin (phalloidin, red) and nuclei (DAPI, blue). Images in A, B and C correspond to maximum intensity projections of approximately half egg chamber (50µm), whereas A' denotes a single optical plane to illustrate LTP accumulates at the surface of nurse cells. Stage 8, 9 and 10 egg chambers are labeled. LTP starts to significantly accumulate at stage 9 and peaks at stage 10. (D-E) Wing imaginal discs of wild type (D) and *Df(3R)lpr1/2* (E) genotypes showing LTP distribution. LTP is absent from the lipophorin receptor double mutant disc. Inset in D displays an optical cross-section (a: apical, b: basal) at higher magnification (4.5x) through the region of the disc marked with a bar. LTP mostly accumulates in basolateral membranes. Imaginal discs are outlined with a white line. A-C and D-E are shown at the same magnification. Scale bars: 100µm.

doi:10.1371/journal.pgen.1005356.g002

which included the *apoLTP* promoter and the first non-coding exon, without affecting neighboring genes (S4 Fig). Accordingly, the novel mutation was named *apoLTP[excDG06206]*. In homozygous animals, embryogenesis was not affected. However, larvae remained small after

hatching and eventually died after a prolonged first instar (S4 Fig, see also [4]). We observed a strong accumulation of neutral lipids in the gut of mutant larvae (S4 Fig), a phenotype also described by Palm et al. that reflects an essential role of LTP in the transfer of lipids from the gut to lipophorin [4]. The phenotype was caused by *apoLTP* loss of function since it could be completely rescued by a genomic BAC containing an *apoLTP* transgene. To examine *apoLTP* loss of function phenotype in adults, we silenced it in the fat body, the only tissue where the gene is expressed [4], by the temporally controlled expression of a *UAS-apoLTP-RNAi* transgene using the Gal80^{ts} technique [24] and the driver *Cg-gal4*, which is expressed in larval and adult fat body ([25] and S5 Fig). The most obvious phenotype was a pronounced reduction in female fertility two days after the activation of *UAS-apoLTP-RNAi*. In these animals, a fraction of the follicles degenerated. However, those that reached vitellogenic stages displayed strongly diminished levels of intracellular neutral lipids in nurse cells and oocytes (Fig 3A and 3B). Thus, LTP is required for the accumulation of neutral lipids by vitellogenic follicles. Silencing *apolipophorin* for six days using an equivalent approach resulted in a similar blockage of lipid uptake in ovarian follicles (Fig 3C). Thus, both lipophorin and LTP are required for the acquisition of neutral lipids during vitellogenesis.

To examine LTP requirement in imaginal discs, we silenced *apoLTP* in the fat body as before for four days. Since this treatment delays larval growth, we staged the animals by selecting white pupa, a developmental period that last for about one hour. *apoLTP* silenced pupa had imaginal discs of wild type size but notably reduced levels of neutral lipids compared to controls (S6 Fig and [4]), indicating that LTP is also required for lipid accumulation in imaginal discs.

Several hypotheses can account for the observed reduction in lipid droplets in ovaries and imaginal discs. LTP-lipophorin receptor complexes could be required locally in these tissues for lipid uptake. Alternatively, the phenotypes could be indirectly caused by the blockage of lipophorin loading with lipids at the gut and the resulting decrease in lipid content of circulating lipophorin [4]. Finally, a combination of the two effects is also possible. However, the fact that LTP accumulates in nurse cells and imaginal disc cells plasma membranes and that only lipophorin receptor isoforms that mediate lipid uptake do induce this recruitment (Figs 1 and 2) support a direct involvement of LTP in the transfer of lipids from circulating lipophorin to nurse cells and imaginal disc cells.

An extended LA-1 domain occurring in a subset of lipophorin receptor isoforms is essential for the interaction with LTP

The observation that isoform Lpr2E physically interacted with LTP but isoform Lpr2F did not indicated that protein domains specifically present in Lpr2E were required for binding. To identify them, we assayed chimeric receptors generated by domain swapping between Lpr2E and Lpr2F (S7 Fig). It was previously shown that a 232 amino acids N-terminal region of Lpr2E was essential for neutral lipid uptake and for lipophorin extracellular stabilization (S7 Fig and [13]). Thus, we first tested whether the same N-terminal region played a role in LTP binding. To this end, we overexpressed the transgene *UAS-Lpr2F+LA1+NCN* coding for a chimera containing Lpr2E 232 amino acids N-terminal region fused to Lpr2F, in the posterior compartment of wing imaginal discs. This chimera induced LTP accumulation in basolateral plasma membranes as well as in intracellular vesicles, a phenotype identical to that of Lpr2E (compare Fig 4E and 4A). Thus, the 232 amino acids N-terminal domain of Lpr2E is required for the interaction with LTP. This region includes a specific LDLR A domain (LA-1) preceded by a stretch of 16 amino acids that is conserved between lipophorin receptors of several high dipteran species and that we call "extension domain" (ED), since it appears to extend the LA-1

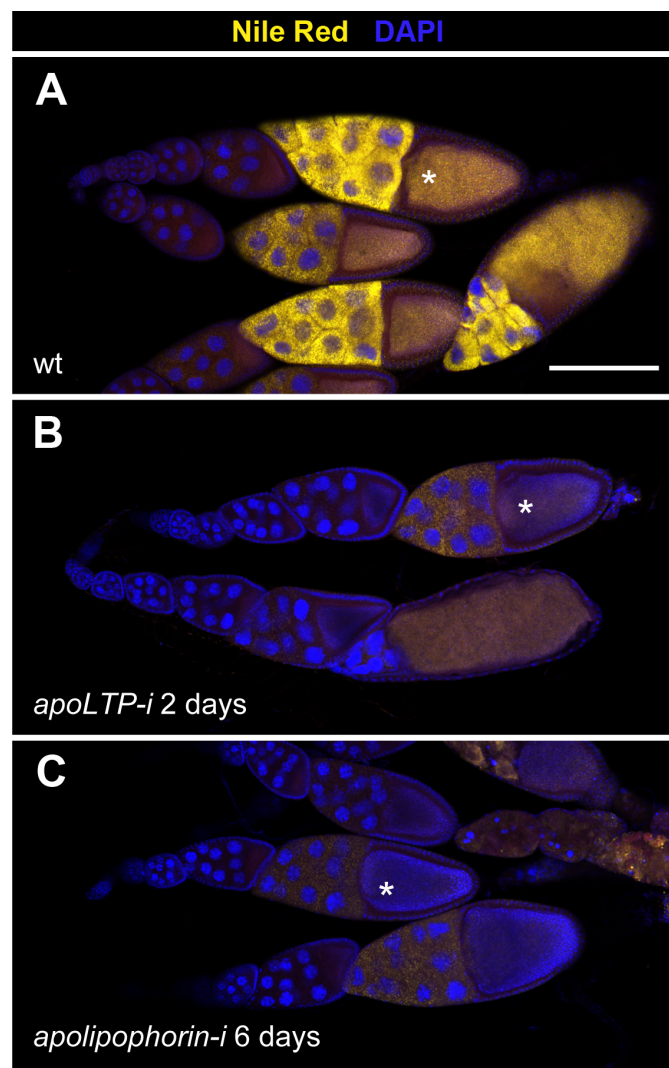


Fig 3. LTP is required for neutral lipid accumulation in ovaries. (A-C) Ovarioles containing egg chambers of progressive stages of development, with most mature egg chambers to the right. Neutral lipids are revealed by Nile red staining in yellow, nuclei (DAPI) in blue. Asterisks indicate vitellogenic egg chambers of an equivalent developmental stage (10b). (A) Wild type. (B) *apoLTP* was silenced in the fat body for two days prior dissection of the ovaries by the expression of *UAS-apoLTPi* driven by *Cg-gal4*. Temporal control was provided by a *tub-gal80^{TS}* transgene. (C) *apolipophorin* was similarly silenced in the fat body for six days prior to dissection. Scale bar: 100µm.

doi:10.1371/journal.pgen.1005356.g003

domain ([S7 Fig](#), underlined in red). In addition, Lpr2E and Lpr2F contain specific signal peptides. To examine which domains of the N-terminal region are involved in LTP binding, we tested additional chimeras in the same assay. Addition of LA-1 to Lpr2F (*UAS-lpr2F+LA1*) did not change the activity of the protein ([Fig 4F](#), compare with [Fig 4B](#)). However, further addition of the 16 amino acids ED domain generating the chimera *UAS-lpr2F+LA1+ED*, provided a strong capacity to bind LTP ([Fig 4I](#)). In contrast, a similar chimera lacking LA-1 (*UAS-Lpr2F+NCN*) was unable to mediate LTP accumulation ([Fig 4J](#)). In conclusion, an LA-1 domain

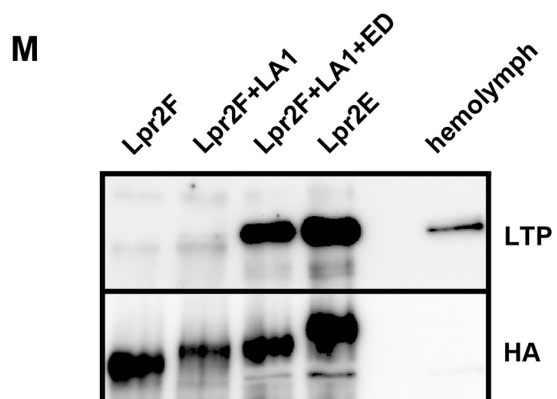
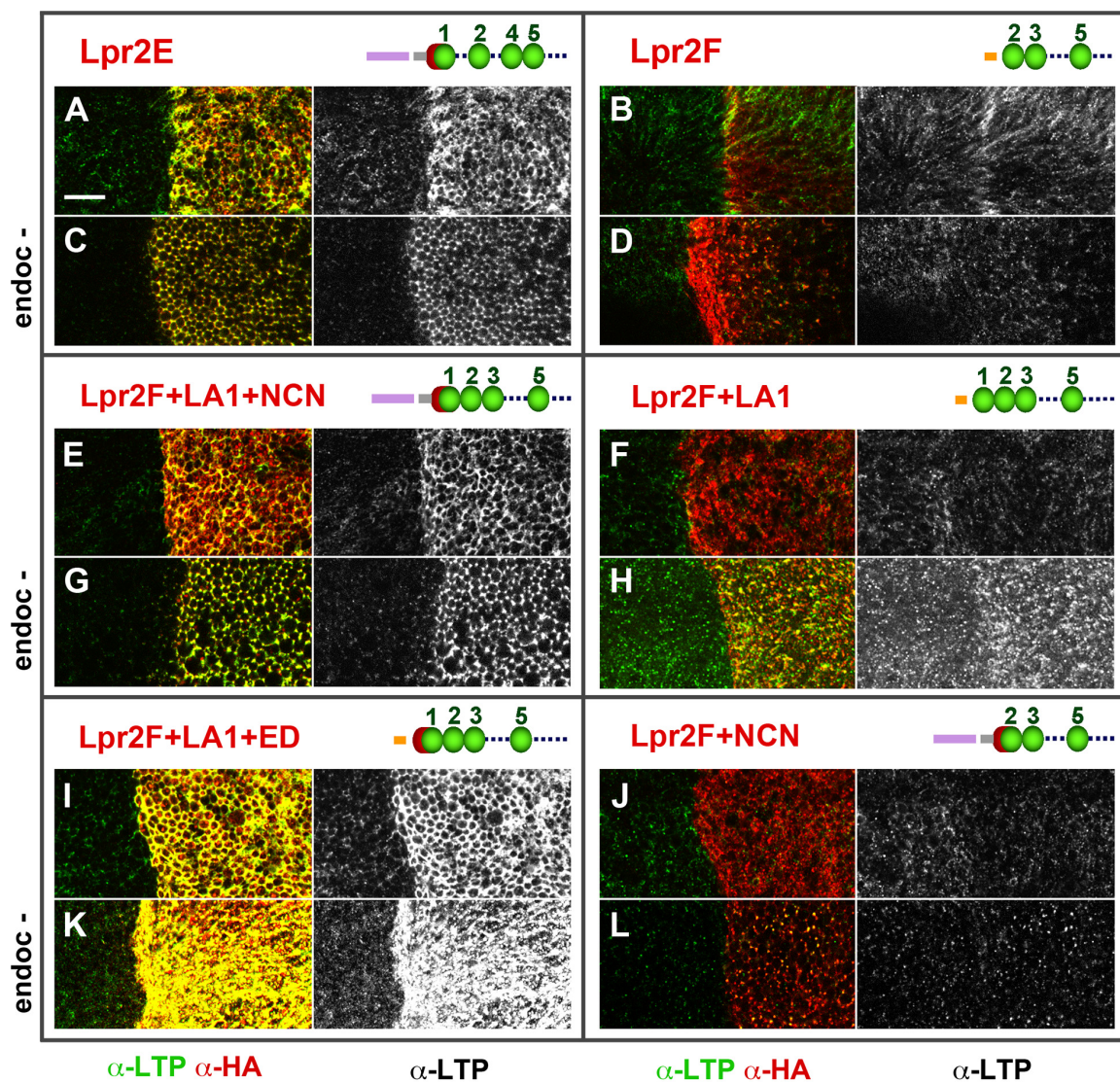


Fig 4. An extended LA-1 domain found in a subset of lipophorin receptor isoforms is required for robust LTP binding. (A-L) Wing imaginal discs shown at a basal plane, overexpressing in the posterior compartment the indicated lipophorin receptor isoforms and chimeras (α -HA, red). LTP distribution is shown in green and also in a separate channel. Panels marked as "endoc-" show imaginal discs in which endocytosis was blocked for three hours prior to dissection by inactivation of a temperature sensitive *shibire* allele (C, D, G, H, K and L). Drawings of the relevant N-terminal region of the receptors are included, the LA domains shown as green beads, the extension domain as a red half-sphere and Lpr2E and Lpr2F signal peptides as violet and orange bars respectively. The grey bar represents the non-conserved region of Lpr2E N-terminal domain. See (S7 Fig) for a more complete description of the chimeras used. All images are shown at the same magnification. Scale bar: 10 μ m. (M) Co-IP of LTP with several lipophorin receptor isoforms and chimeras, as indicated. Lpr2F, Lpr2F+A1, Lpr2F+A1+ED and Lpr2E were expressed and purified from *Drosophila* S2 cells and incubated with diluted wild type hemolymph. The lipophorin receptors and chimeras were immunoprecipitated with α -HA and the eluates assayed by western blot with α -LTP (upper panel) and α -HA (lower panel). Last lane contains hemolymph.

doi:10.1371/journal.pgen.1005356.g004

preceded by a stretch of 16 conserved amino acids (ED) is essential for a robust interaction between the lipophorin receptors and LTP.

A similar set of experiments was performed under conditions in which endocytosis was blocked for three hours before dissection using a temperature sensitive *shibire* (*shi*) allele, *Drosophila* Dynamin homolog. Under these conditions, receptors as well as their ligands accumulate at the cell surface improving their detection by immunostaining [26]. Consistent with our previous results, after blocking endocytosis we observed strong LTP extracellular accumulation in basolateral membranes for all isoforms and chimeras containing LA-1+ED domains (Fig 4C, 4G and 4K) and no effect on LTP distribution for Lpr2F or the chimera lacking LA-1 (Fig 4D and 4L). Interestingly, the chimera that contained LA-1 but not the ED (*UAS-lpr2F+LA1*) did promote a moderate LTP accumulation that was undetectable under normal conditions (Fig 4H). These results suggest that the LA-1 domain provides some capacity to bind LTP but the interaction is potentiated by the 16 conserved amino acids that precede it.

In vitro co-IP experiments examining the affinity between Lpr2F-Lpr2E chimeras and LTP gave results that were consistent with the previous in vivo data. We could not detect an interaction above background with Lpr2F (Fig 4M). Addition of the LA-1 module to Lpr2F conferred a very weak affinity. However, when the ED was also included, the interaction with LTP was robust and similar to that of Lpr2E (Fig 4M). Thus, ED synergizes with LA-1 to bind LTP.

In *Drosophila*, the extended LA-1 domain is present in five lipophorin receptor isoforms in addition to Lpr2E [13]. We tested two of them, Lpr1H and Lpr1J, for their capacity to interact with LTP and in both cases we saw LTP accumulation after overexpression in imaginal discs (S8 Fig). In contrast, no LTP stabilization was observed with isoform Lpr1M, which does not contain the extended LA-1 module (S8 Fig). Taken together, our results indicate that only Lpr1 and Lpr2 isoforms or chimeras containing the LA-1 module can bind LTP. Since the LA-1 module is also essential for the lipophorin receptors to mediate lipid uptake [13], our results strongly support a direct role of LTP-lipophorin receptor complexes in the cellular acquisition of lipids.

LTP promotes a transient stabilization of lipophorin in the plasma membrane

Our results suggest that LTP recruitment to the plasma membrane mediated by a subset of lipophorin receptor isoforms is an essential component of the lipid uptake mechanism. Expression of Lpr2E but not of Lpr2F, also promotes a stabilization of lipophorin in the extracellular matrix of imaginal disc cells that is visible by an immunostaining protocol performed without permeabilization of cell membranes. This lipophorin stabilization might be related to the lipid transfer process [13]. Thus, we decided to examine whether LTP recruitment to cells was required for lipophorin stabilization or whether they were independent phenomena. To silence *apoLTP* and test for lipophorin stabilization in imaginal discs, we expressed a *UAS-apoLTPi* and a *UAS-Lpr2E* transgenes simultaneously in the fat body (*Cg-gal4*) and in imaginal discs

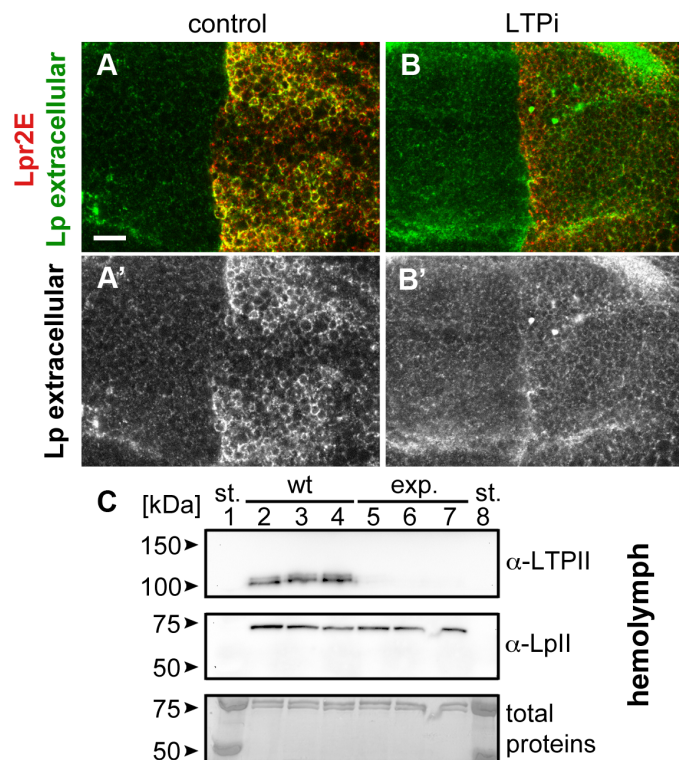


Fig 5. Lpr2E-mediated lipophorin extracellular stabilization requires LTP. (A and B) Wing imaginal discs expressing *UAS-lpr2E* in the posterior compartment, driven by *hh-gal4*. Lpr2E-HA is shown in red and extracellular lipophorin in green and also in a separate channel (A' and B'). (A) Control disc. (B) *apoLTP* was silenced by the expression of *UAS-apoLTPi* in the fat body driven by *Cg-gal4* for 2 days prior dissection. Temporal control was provided by a *tub-gal80^{ts}* transgene. A strong reduction in lipophorin accumulation was observed. Note that for technical reasons, the complete genotype of *apoLTPi* animals shown in (B) was *Cg-gal4,tub-gal80^{ts}/UAS-lpr2E;hh-gal4/UAS-apoLTPi*. Thus, *UAS-lpr2E* and *UAS-apoLTPi* were co-expressed both in the fat body and in imaginal discs. However, this does not have unintended effects, as shown in the next panel and in (S9 Fig). Scale bar: 10μm. (C) Western blot of hemolymph samples from wild type (wt, lanes 2–4) and the experimental animals (exp., lanes 5–7) described in (B). LTP and lipophorin were detected using the indicated antibodies. Three biological replicates were analyzed for each genotype. Total proteins stained with colloidal coomassie are shown as loading control at the bottom. Molecular weight markers were loaded in lanes 1 and 8. Circulating LTP levels are undetectable in the experimental animals whereas lipophorin levels are equivalent to the control.

doi:10.1371/journal.pgen.1005356.g005

(*hh-gal4*). Expression was temporally controlled by the Gal80^{ts} technique [24]. We reasoned that *UAS-apoLTPi* expression would silence *apoLTP* in the fat body and have no effect in imaginal discs, where *apoLTP* is not expressed. To exclude the possibility that *UAS-lpr2E* expression in the fat body would affect lipophorin secretion, we examined lipophorin levels in the hemolymph of these larvae two days after the activation of the transgenes. We did not see a difference with the wild type, even though LTP was undetectable (Fig 5C), validating the use of these animals. As previously reported, *UAS-lpr2E* overexpression in otherwise wild type imaginal discs induced the stabilization of lipophorin in basolateral cell membranes (Fig 5A). However, this accumulation was strongly diminished in the *apoLTP* silenced animals described before (Fig 5B), in which LTP is undetectable in imaginal discs and fat body (S9 Fig). Thus, Lpr2E-mediated extracellular stabilization of lipophorin requires circulating LTP and probably, its recruitment to the plasma membrane. If this conclusion were correct, we would expect

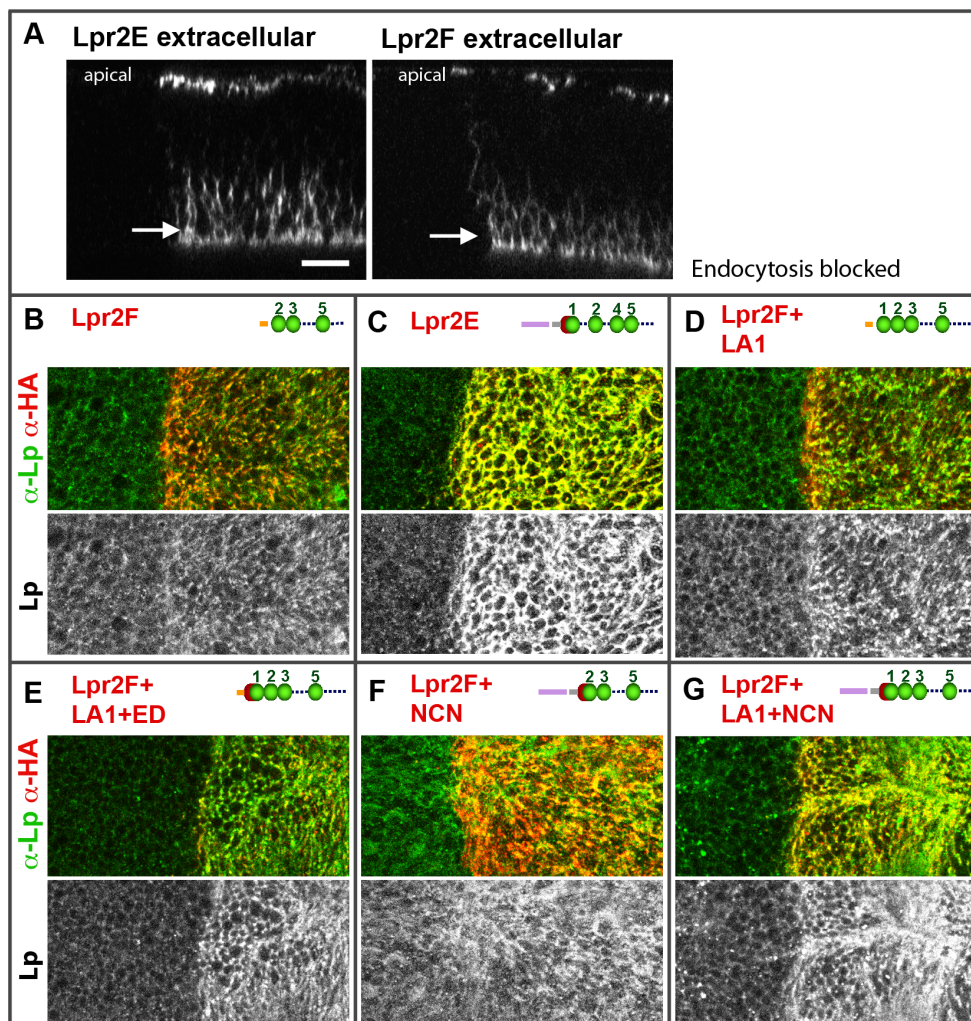


Fig 6. The LA-1 and ED domains of the lipophorin receptors are required for robust lipophorin stabilization in imaginal discs. (A) Optical cross-sections of wing imaginal discs expressing *UAS-lpr2E-myc* and *UAS-lpr2F-myc* in the posterior compartment, as indicated. Extracellular proteins were detected by an immunohistochemical protocol performed without cell permeabilization. Lpr2E and Lpr2F accumulate at similar levels in two domains, apical cell membranes and a basal region. (B–G) Wing imaginal discs expressing different lipophorin receptor isoforms and chimeras in the posterior compartment, as indicated. All images were taken at a basal plane of the imaginal discs. Its approximate location is indicated by arrows in A. Lipophorin (green and also in a separate channel) and the overexpressed lipophorin receptors and chimeras (red, detected with α -HA) are shown. All immunostainings were performed after blocking endocytosis for 2.5 hours. (A–G) Shown at the same magnification. Scale bar: 10 μ m.

doi:10.1371/journal.pgen.1005356.g006

that the capacity of Lpr2E-Lpr2F chimeras to bind LTP would parallel their ability to promote lipophorin extracellular stabilization. To examine this prediction, we used the assay described in the previous section, the expression of Lpr2E, Lpr2F and their chimeras under conditions of blocked endocytosis. Overexpression of Lpr2E induced an accumulation of lipophorin mostly in basolateral membranes (Fig 6C). In contrast, Lpr2F expression had a very limited effect (Fig 6B), even though both isoforms were detected at similar levels at the plasma membrane under these conditions, as shown by extracellular immunostaining (Fig 6A). We then tested chimeras *UAS-Lpr2F+LA1*, *UAS-Lpr2F+LA1+ED*, *UAS-Lpr2F+NCN* and *UAS-Lpr2F+LA1+NCN* (Fig 6D–6G, see S7 Fig for a description of these chimeras). Adding module LA-1 to Lpr2F only

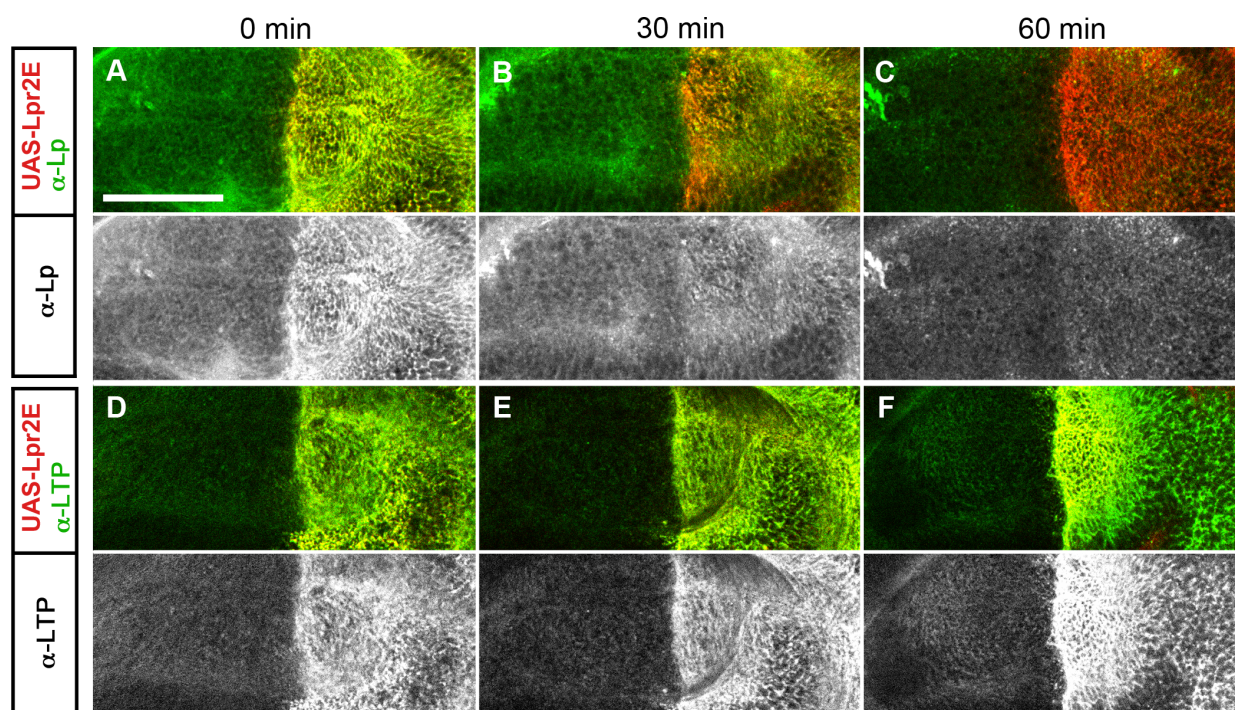


Fig 7. Lpr2E-mediated lipophorin association with cells is transient. (A-F) Basal optical sections of imaginal discs expressing *UAS-lpr2E* in the posterior compartment (red). Endocytosis was inhibited for 3 hours and the discs were either fixed immediately (A and D) or washed for 30 minutes (B and E) or for 60 minutes (C and F) in ice-cold cell culture media, as indicated. The distribution of Lipophorin (A-C) and of LTP (D-F) is shown in green, also in separate channels as indicated. Scale bar: 50μm.

doi:10.1371/journal.pgen.1005356.g007

slightly increased lipophorin accumulation (Fig 6D). However, addition of LA-1 plus ED or addition of the complete N-terminal region from Lpr2E, converted Lpr2F into a chimeric receptor with the same capacity as Lpr2E to mediate lipophorin accumulation (Fig 6E and 6G). The LA-1 domain was essential for this increased accumulation, since the chimera *UAS-Lpr2F* +NCN that lacks LA-1 had almost no effect (Fig 6F). Thus, the extended LA-1 domain is required both, for LTP binding (Fig 4) and for robust lipophorin accumulation in the plasma membrane (Fig 6). Together with our previous results, this strongly suggests that lipophorin receptor-mediated LTP recruitment to the plasma membrane helps stabilize lipophorin. The molecular mechanisms involved are unclear. Lipophorin receptors, LTP and lipophorin could bind cooperatively. However, in co-IP experiments Lpr2E readily pulled down LTP from hemolymph but lipophorin could not be detected above background (Fig 1A), suggesting a trimeric complex does not form in vitro. Alternatively, lipophorin stabilization could represent a functional intermediate during the process of lipid transfer to cells, maybe by direct contact between lipophorin particles and LTP. In this direction, we observed that Lpr2E-mediated lipophorin accumulation in cell membranes was transient. A 30 minutes wash of unfixed imaginal discs in ice-cold cell culture media strongly reduced lipophorin signal (Fig 7A and 7B). In contrast, LTP staining was not affected, even after a 60 minutes wash (Fig 7D–7F), further suggesting that a stable Lpr2E-LTP-lipophorin complex does not form. Rather, transient interactions between lipophorin and LTP could be limited to the duration of the lipid transfer process. Additional experiments would be required to reach a definitive conclusion.

Discussion

During development and growth, tissues exhibit changing requirements for an external supply of lipids. For instance, oocyte maturation involves a massive uptake of neutral lipids from hemolymph. Development of *Drosophila* imaginal discs is also accompanied by an increase in intracellular lipid droplets, which is most striking in the wing pouch area of the wing discs. This accumulation is mediated, at least in part, by the expression of lipophorin receptors of the LDLR family in the area [13]. However, the molecular mechanisms involved are still unclear. It was shown that blocking endocytosis did not inhibit neutral lipid uptake [13], ruling out a mechanism similar to the uptake of cholesterol by human LDLR [27]. This conclusion is consistent with biochemical studies indicating that in insects, lipophorin functions via a reusable shuttle mechanism [28,29]. An alternative model, inspired by mammalian chylomicron and VLDL metabolism [30], posits that lipophorin binding to the lipophorin receptors bring these particles near the plasma membrane where putative lipases and lipid transporters associated to the plasma membrane or to the extracellular matrix make lipophorin lipids available to cells [2,29]. However, lipophorin is detected at high levels in the extracellular matrix of most cells by immunohistochemistry, independently of lipophorin receptors expression. This localization is mediated, at least in part, by the interaction of lipophorin with heparan sulfate proteoglycans (HSPG) [31]. Thus, recruitment of lipophorin to the cell surface is not sufficient for lipid uptake. The results we present here support a different model in which the central event that initiates the transfer of lipids to imaginal disc cells and oocytes is the recruitment of the lipoprotein LTP to the plasma membrane mediated by a subset of lipophorin receptor isoforms. Three lines of evidence support this conclusion. First, lipophorin receptor isoforms that mediate lipid uptake also promote the recruitment of LTP to the plasma membrane (Figs 1, 2, S8 and [13]). Second, deletion of the LA-1 domain in the lipophorin receptors disrupts LTP binding and also impairs lipid uptake (Fig 4 and [13]), strongly suggesting that LTP binding is required for lipophorin receptor-mediated neutral lipid uptake. Third, lipophorin receptors induce a stabilization of lipophorin in the plasma membrane associated to the lipid uptake process. We showed that LTP is required for this stabilization (Figs 5 and S9). Accordingly, only the lipophorin receptor isoforms and chimeras that bind LTP and mediate lipid uptake are also able to induce lipophorin stabilization (Fig 6). Finally, we show that animals with low levels of circulating LTP display a severe reduction in the lipid content of ovaries and imaginal disc, a phenotype that is consistent with a local requirement of LTP for lipid uptake (Figs 3 and S6). However, since LTP is also required for the loading of lipophorin with lipids in the gut (S4 Fig and [4]), the decreased lipid content of lipophorin in the hemolymph of these animals could also contribute to the previous phenotype. The model we propose is consistent with the biochemical activity described for LTP in insects. In particular, experiments in which *Bombyx mori* ovarioles were cultured in medium containing radiolabeled lipophorin indicated a transfer of DAG from lipophorin to ovarioles. This transfer was inhibited by anti-LTP antibodies and restored by the addition of purified LTP, demonstrating an essential and local role of LTP in lipid uptake [18].

At the mechanistic level, LTP was suggested to use a carrier mechanism. LTP would acquire and store a limited amount of lipids from a donor lipophorin particle or cell and subsequently transfer them to a receptor. This process would not require the formation of a ternary complex between donor, acceptor and LTP [32]. Interestingly, electron microscopy studies showed that LTP particles displayed a remarkable shape with two well differentiated regions, a spherical, lipid containing head and a tail region that appeared to include a flexible hinge. It was suggested that this flexible tail would allow LTP to alternate between two conformations, contacting with lipid donor and acceptor during the lipid transfer process [15,33]. These observations

prompt us to speculate that during lipid uptake, LTP recruited to the plasma membrane by the lipophorin receptors might alternately contact lipophorin particles and the plasma membrane, transferring an amount of DAG and possibly other lipids in each cycle. The interaction between LTP and lipophorin might transiently stabilize lipophorin in the extracellular matrix, as suggested by our results (Figs 5–7 and S9). Binding of the lipophorin receptors to LTP involves the LA-1 and ED domains (Fig 4). It is tempting to speculate that they would bind to LTP tail, which would leave the head region free to interact with lipophorin and the plasma membrane. An important question still completely unsolved is how lipids are incorporated into the cell. Lipids could be directly added to the lipid bilayer by LTP or alternatively, transmembrane lipid transporters might be required.

A surprising finding from our study is that all lipophorin receptor isoforms display low affinity for lipophorin, since we could not detect an interaction between Lpr2E or Lpr2F and lipophorin by co-IP, even though LTP interaction with Lpr2E was readily detected (Fig 1A). This is also supported by our *in vivo* results. Lpr2F overexpression promotes a very weak accumulation of lipophorin in imaginal discs under conditions of blocked endocytosis (Fig 6B). Isoform Lpr2E induces a much higher accumulation (Fig 6C) but this effect is indirect, since it requires LTP (Fig 5). More generally, we observed that lipophorin accumulation in the extracellular matrix of imaginal discs was very labile since short incubations of the unfixed tissue with ice cold buffer strongly reduced lipophorin staining (Fig 7). These observations suggest that there is a pool of lipophorin weakly associated to the extracellular matrix through low affinity interactions with HSPG [31], the lipophorin receptors or other still unidentified receptors. Entrapment of lipophorin in extracellular spaces close to the plasma membrane was described in other insects by electron microscopy [34]. This lipophorin pool would be in a dynamic equilibrium with hemolymph lipophorin, allowing lipid-depleted particles generated after the transfer of their lipid cargo to cells to quickly be replaced by lipid-rich lipophorin from the hemolymph. A high affinity binding of lipophorin to its receptors would impair such exchange.

A pending issue in our understanding of insect lipid metabolism is the role of lipophorin endocytosis [35–37]. As mentioned above, there is compelling evidence in *Drosophila* and in other insects indicating that endocytosis is not required for neutral lipid uptake. Blocking endocytosis with a *rab5*² allele did not hamper lipid uptake in *Drosophila* ovaries [13]. Similarly, we blocked endocytosis for 8 hours in clones of *shi*^{ts} homozygous cells in imaginal discs and did not observe changes in the lipid droplets accumulation pattern (S2 Fig), suggesting that also in imaginal discs, endocytosis is not required for lipid uptake. Moreover, it was shown that chemical inhibition of the endocytic pathway did not interfere with LTP-mediated lipid exchange between lipophorin and the fat body in locust [19,35]. However, other data indicates that lipophorin particles are endocytosed in certain tissues. For example, locust fat body explants internalized fluorescently labeled lipophorin *in vitro*, an activity that was maximal in young adults. The internalized particles did not accumulate in the fat body and were suggested to be resecreted [35,37]. In addition, lipophorin receptors induced lipophorin endocytosis in transfected mammalian cells [12,36] or insect cells [37]. Also, overexpression of the lipophorin receptors induced lipophorin endocytosis in imaginal discs [23,38]. Interestingly, we observed that all tested lipophorin receptor isoforms induced lipophorin endocytosis in imaginal discs irrespectively of their capacity to mediate the acquisition of neutral lipids (S2 Fig). Thus, available data clearly indicates lipophorin receptors endocytic activity and their capacity to mediate cellular acquisition of neutral lipids are independent of each other. However, it is still possible that endocytosis is important for the acquisition of minor lipid species present in lipophorin [35].

LTP plays additional roles besides mediating lipophorin receptor-dependent lipid transfer from lipophorin to tissues. In particular, LTP is critical for the loading of lipophorin with lipids in the midgut (S4 Fig and [4,16,17]). However, in this case the molecular mechanisms involved appear to be different. First, in the midgut LTP is mostly found in the cytoplasm of enterocytes and not in the cell surface [4]. Second, the lipophorin receptors are not essential for LTP activity in the midgut since *lpr1*⁻, *lpr2*⁻ animals do not display the massive increase in gut lipids characteristic of *apoLTP* mutants. The receptors that mediate LTP endocytosis in the midgut are not known. We have shown that Lpr2E is able to endocytose LTP in imaginal disc (Fig 1C and 1F and 1G). Since the lipophorin receptors are also expressed in the midgut [39], they could contribute to LTP endocytosis, even though other redundant receptors must necessarily exist. LTP was also shown to mediate the bidirectional transfer of lipids between the larval fat body and lipophorin in *Manduca sexta* [19]. In this direction, we observed that Lpr2E overexpression in the fat body increases LTP in the plasma membrane and also induces an LTP-dependent accumulation of lipophorin (S9 Fig), pointing to a potential role of these receptors in LTP activity in the fat body. However, in lipophorin receptor mutants LTP distribution in the fat body does not significantly change (S3 Fig), suggesting that other LTP receptors must exist.

An important question in lipid metabolism concerns the selectivity of lipid transfer between lipophorin and tissues. Our results suggest that expression of the lipophorin receptors promotes the transfer of DAG to cells, where it accumulates as TAG in lipid droplets, a process that requires LTP. However, uptake of other lipid species could also be facilitated by LTP. In this direction, LTP was shown to catalyze the transfer of DAG, phospholipids, hydrocarbons and cholesteryl esters between lipoproteins in vitro, but not of cholesterol, which can be exchanged through the aqueous phase [40]. However, the rates of facilitated transfer were found to be variable and dependent on the specific nature of the donor and acceptor particles, making it difficult to extrapolate to LTP specificity in vivo. In this direction, it was reported that *apoLTP* silencing in *Drosophila* induced changes in the composition of lipophorin DAG and sterols, suggesting LTP participates in the loading of these lipid species into lipophorin [4]. Thus, the lipophorin receptors, by recruiting LTP, may promote the uptake of most lipid species present in lipophorin. On the other hand, proteins that mediate the uptake of lipids with a high degree of specificity have also been described. In *Bombyx mori*, the CD36 proteins SCRB15 and Cameo2 mediate the selective uptake of β -carotene and lutein respectively into the silk gland despite both carotenoids being similarly transported in lipophorin particles [41]. Unfortunately, the molecular basis of this selectivity or the participation of the lipophorin receptors or LTP in the process is unknown.

Materials and Methods

Genetics

The following alleles and transgenes were used: *shi*^{ts} [42], *Df(3R)lpr2* and *Df(3R)lpr1/2* [13], *UAS-Rab5-GFP* [43], *UAS-Lamp-GFP* [44], *UAS-apoLpp-RNAi* (stock 106311 from VDRC), *hh-Gal4* [45], *Cg-Gal4* [25], *FB-Gal4* [46], *V32-Gal4* (a gift from Daniel St Johnston) and *tub-Gal80*^{ts} [24].

To generate the *apoLTP[excDG06206]* mutation, we induced the imprecise excision of transposon *P{wHy}DG06206* following the protocol described in [47]. The extent of the deletion was mapped by inverse PCR and sequencing of the resulting fragments.

Clones of cells homozygous for the *shi*^{ts} allele in imaginal discs were induced by heat shocking *shi*^{ts}, *FRT9-2/Ubi-GFP*, *FRT9-2;hs-flp/+* larvae for one hour at 37°C, 48–72 hours AEL. After heat shock, larvae were cultured at 18°C and switched to the restrictive temperature (33°C) for

8 hours before dissection. Blocking endocytosis for 10 hours or more induced severe morphogenetic phenotypes in imaginal discs.

To overexpress Lpr2E in the posterior compartment of wing imaginal discs in animals with reduced levels of LTP, the following genotype was used: *Cg-gal4, tub-gal80^{ts}/UAS-lpr2E;hh-gal4/UAS-*apoLTP*-RNAi*. The cross was maintained at 18°C and mid third instar larvae were transferred to 29°C for two days to activate the UAS transgenes. Control larvae shown in Fig 6 did not carry the *Cg-gal4, tub-gal80^{ts}* chromosome. Additional controls were performed with larvae of genotype: *Cg-gal4,tub-gal80^{ts}/UAS-lpr2E;hh-gal4/+*, similarly obtaining a robust lipophorin stabilization in the posterior compartment.

To examine protein distribution under conditions of blocked endocytosis, male larvae of the following genotype: *shi^{ts}/Y;UAS-lpr2X/+;hh-Gal4/+*, where *UAS-lpr2X* stands for the different chimeras tested, were placed inside a glass tube and submerged in water at 33°C for 2.5 or 3 hours. Afterwards, they were immediately transferred to ice and dissected at 4°C.

Transgenes and molecular biology

To generate *UAS-lpr2E_ecto_TAP*, a *lpr2E* cDNA fragment coding from Met1 to Glu985 was flanked by Kpn I and Xba I restriction sites and cloned in frame into pUAST-CTAP [48]. *UAS-lpr2F_ecto_TAP* was similarly generated using a fragment comprising from Lpr2F Met1 to Glu782. In both constructs, the transmembrane and intracellular domains were deleted, generating secretable proteins fused to a C-terminal TAP tag. To generate plasmids for expression of full length Lpr2E and Lpr2F proteins fused to a C-terminal TAP tag in the germ line, we first cloned the tag CTAP flanked by engineered Xba I and Spe I sites into the Xba I site of pUASp [49], creating pUASp_TAP. Full-length *lpr2E* or *lpr2F* DNA fragments excluding the stop codons and with engineered Kpn I and Xba I flanking sites were cloned in frame into pUASp_TAP, generating *UASp-lpr2E_TAP* and *UASp-lpr2F_TAP*. Transgenic flies were generated with all four plasmids.

The following transgenes to overexpress Lpr2E, Lpr2F and chimeras as a fusion to a C-terminal 3xHA tag were described in [13]: *UAS-lpr2E*, *UAS-lpr2F*, *UAS-lpr2F+LA1+NCN*, *UAS-lpr2F+LA1*, *UAS-lpr2F+NCN*. To generate *UAS-lpr2+LA1+ED*, first a DNA fragment coding for ED+LA1 domains of Lpr2E (from Leu170 to Thr232) was flanked by Not I sites (each coding for 3 Ala) and cloned into pAc-lpr2F-NotI [13] and transferred to pUASTattb [50]. To introduce a Myc tag into Lpr2E and Lpr2F extracellular domains, NotI sites were first engineered after Lpr2E Glu920 or after Lpr2F Glu717, located between the EGF-C module and the O-glycosylation region. Not I flanked fragments containing six copies of a Myc tag were generated by PCR using pCS2+NLS MT vector as template [51] and cloned into the engineered Not I sites. These cDNAs, also containing a C-terminal 3xHA tag, were transferred to pUASTattB to generate *UAS-lpr2E-Myc* and *UAS-lpr2F-Myc*.

To silence *ApoLTP* by RNA interference (RNAi), an 874 base pair genomic fragment corresponding to part of *ApoLTP* 7th exon was cloned as an inverted tandem repeat containing an intervening 81 base pair region into pBluescript (Stratagene). The tandem repeat was transferred to pUAST and transgenic flies were obtained (*UAS-ApoLTPi*).

To generate an *ApoLTP-myc* genomic rescue transgene, we started from the attB-P[acman]-Cm^R-BW based genomic clone CH321-38C23 [52], which contains a 84241 base pair fragment that includes *ApoLTP*. A 6XMyC tag was inserted in *ApoLTP* C-terminus (after Ser4333) and a V5 tag was inserted after Arg23, two amino acids after the predicted signal peptide cleavage site, by recombineering [53]. We could not obtain transgenic flies with this modified BAC clone, possibly because of its length. Thus, we deleted sequences downstream of *ApoLTP* by recombineering, generating a BAC clone containing a 43241 base pair insert which includes

25645 base pairs upstream and 5087 base pairs downstream of *ApoLTP* CDS. With this shorter BAC, we generated transgenic flies at the CBMSO transgenesis facility. This genomic clone, even though it rescues a null *ApoLTP* mutant, is expressed at lower levels than the endogenous gene. For unknown reasons, we cannot detect the protein using α -V5.

Affinity purification

UAS-lpr2E_ecto_TAP and *UAS-lpr2F_ecto_TAP* were expressed in the larval fat body using the driver *FB-gal4*. Notice that *UAS-lpr2E_ecto_TAP* overexpression delayed growth but eventually larvae reached normal size. Wandering 3rd instar larvae were collected, washed and frozen in liquid nitrogen. 6 g per genotype were used in the experiment. Larvae were powdered in a mortar and pestle in liquid nitrogen and the powder was added to 50 ml of ice cold extraction buffer (20 mM K-HEPES pH 7.9, 50 mM KCl, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.5 mM CaCl₂, 0.5 mM PMSF, 1x protease inhibitor cocktail from Roche). The extract was centrifuged at 4000 rpm in a falcon tube for 5 minutes and the supernatant filtered successively through a 2.7 μ m and 0.7 μ m syringe filters fitted with glass microfiber pre-filters to reduce clogging. For the affinity purification step, we essentially followed the protocol from Puig et al. [22] with some modifications. In particular, the cleared lysate was incubated for 2 hours with 500 μ l of IgG-sepharose matrix (GE) previously equilibrated with extraction buffer. Beads were then washed five times in IPP150-Ca buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 0.5 mM CaCl₂, 0.1% triton X100) and resuspended in CBB buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% triton X100, 2 mM CaCl₂, 10 mM β -mercaptoethanol, 1 mM magnesium acetate, 1 mM imidazole). 30 μ l of TEV protease (10u/ μ l) were added and the reaction allowed to proceed over night at 4°C. The supernatant and two additional 500 μ l washes in CBB buffer were pooled and incubated with 500 μ l of calmodulin-sepharose matrix (GE) for 4 hours at 4°C. Beads were then washed six times for a total time of 30 minutes in CBB buffer and eluted in 500 μ l of CEB buffer (10mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM β -mercaptoethanol, 150 mM NaCl, 1 mM magnesium acetate, 1 mM imidazole, 0.1% triton X-100, 20 mM EGTA) for 20 minutes at 4°C. Proteins were precipitated from the supernatant using the 2-D Clean-Up kit (GE), resuspended in Laemmli buffer and separated by PAGE. Proteins were stained with colloidal Coomassie and bands differentially present in the samples were excised and identified by peptide mass fingerprinting and peptide fragmentation at the "Parque Científico de Madrid" facility.

UASp-lpr2E_TAP and *UASp-lpr2F_TAP* were expressed in the germ line driven by *V32-gal4*. 250 ovaries from 4–5 days old females fed with yeast paste were dissected and homogenated in a Tenbroeck tissue grinder in 500 μ l ice cold lysis buffer (10mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.5 mM CaCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.5 mM PMSF and 1x Roche protease inhibitor cocktail). The homogenate was kept on ice for 10 minutes and centrifuged at 16,000g for 15 minutes. Cleared lysates from 4,000 ovaries were pooled and filtered through a 0.22 μ m syringe filter, obtaining a total of 5.5 ml of extract. Affinity purification of Lpr2E_TAP and Lpr2F_TAP was performed in a single step using IgG coated dynabeads. Conjugation of dynabeads M-270 Epoxy (Invitrogen) with rabbit IgG was performed as described [54]. 5.5 ml of ovary extract was incubated with 30 mg IgG-coated dynabeads for 2 hours at 4°C with continuous shaking. The magnetic beads were then washed five times in cold lysis buffer for a total of 30 minutes and bound proteins eluted by cleavage of the TAP tag with TEV protease (150 u) in 200 μ l of lysis buffer supplemented with 1 mM DTT during 3 hours at 4°C. Proteins were precipitated from the supernatant, separated and processed for mass spectrometry analysis as before.

Co-immunoprecipitation

To express Lpr2E-HA and Lpr2F-HA in S2 cells, UAS-lpr2E or UAS-lpr2F [13] plasmids were co-transfected with pAC-Gal4 [55]. About 4.5 million cells were lysated in 300 μ l lysis buffer (150mM NaCl, 20 mM Tris HCl pH 7.8, 0.5% triton X-100, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1x Roche protease inhibitor cocktail) by one cycle of freezing and thawing. The lysate was cleared by centrifugation at 16,000 g for 5 minutes and added to protein G dynabeads (Invitrogen) conjugated to mouse anti-HA (Santa Cruz Biotechnology) following manufacturer instructions. Beads were incubated with the lysate for 10 minutes at room temperature, washed twice with lysis buffer and incubated with 100 μ l of diluted hemolymph for one hour at 4°C with shaking. After three washes in washing buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.1% triton X-100), proteins were eluted from dynabeads by boiling in Laemmli buffer for 4 minutes. Diluted hemolymph was prepared as follows: 50 wild type wandering larvae were washed, dried and placed in 350 μ l of ice cold hemolymph buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7.8, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1x Roche protease inhibitor cocktail). Under the dissecting microscope, larvae were pierced with a pair of forceps so that hemolymph bled out into the buffer. The diluted hemolymph was collected and centrifuged for 5 minutes at 5,000 rpm to remove cells and tissue debris. Diluted hemolymph was used immediately after being prepared.

Immunohistochemistry

The following antibodies were used in this work: rabbit α -ApoLTPI and α -ApoLTP II [4], rabbit α -LpFL and rabbit α -LpII [5], rat α -HA (Roche), mouse α -HA (Santa Cruz Biotechnology) and mouse α -Myc (DSHB). Immunostaining of imaginal discs and ovaries as well as immunostaining of extracellular proteins was performed as described [13]. To examine the stability of lipophorin association to Lpr2E in vivo (Fig 7), wing imaginal discs were dissected in Sf-900 II SFM culture media (gibco) at 4°C and incubated in the same media for 30 minutes or 60 minutes, also at 4°C. They were subsequently fixed and processed following standard protocols. Lipids were visualized by Nile red or by oil red O stains. For Nile red, fixed imaginal discs or ovaries were incubated with 0.002% Nile red dye diluted in PBS and 0.3% triton X-100 for 60 minutes and washed for 10 minutes in the same buffer without the dye. For oil red O stain, fixed imaginal discs were incubated in a 0.5% solution of oil red O in propylene glycol at 60°C for one hour and then washed twice in 85% propylene glycol and three times in PBS, essentially as described in [56].

Hemolymph extraction

To quantitatively compare LTP and lipophorin levels in hemolymph, we placed two washed and dry larvae on a piece of parafilm on ice and pierced them with a pair of forceps. Hemolymph was collected by capillarity filling 0.5 μ l glass micropipettes (Drummond) and immediately transferring the contents to 20 μ l Laemmli buffer for western blot analysis.

Supporting Information

S1 Fig. (A) Coomassie-stained SDS-PAGE gel showing pull-downs from ovary extracts of a wild type (wt) stock or from flies expressing full-length lipophorin receptors UASp-Lpr2F_TAP or UASp-Lpr2E_TAP in the germ-line driven by V32-gal4. TAP-tagged proteins were pulled-down in a single step using IgG-conjugated Dynabeads. (B) Similar Coomassie-stained gel showing pull-downs from total larvae extracts. The secreted UAS-lpr2F_ecto_TAP and UAS-lpr2E_ecto_TAP were expressed in the fat body driven by FB-gal4. The purification was carried out in two steps, using IgG-Sepharose and Calmodulin-Sepharose matrices. The

following protein bands were identified by mass spectrometry: 1- ApoLTP, 2- CG8507 (α -2-macroglobulin receptor-associated protein) and 3- Peroxidase. Asterisks indicate overexpressed TAP-tagged baits. IgG light chain position is marked by an arrow. St: molecular weight standard.

S2 Fig. Lipophorin receptor-mediated lipophorin endocytosis in imaginal discs. (A-C) *UAS-Rab5-GFP*, an early endosome marker, and either *UAS-Lpr2E* (A and B) or *UAS-Lpr2F* (C) isoforms were expressed in the posterior compartment of wing imaginal discs driven by *en-gal4*. The lipophorin receptors, detected with an anti-HA antibody, are shown in blue, Rab5-GFP in green and lipophorin in red. Individual channels are also included for clarity. A confocal cross-section (A) and apical sections (B and C) are shown. Lpr2E and Lpr2F induce lipophorin endocytosis. Multiple vesicles containing lipophorin, Rab5 and the lipophorin receptor can be identified; some of them are indicated by yellow arrows. (D) Imaginal disc containing clones of *shi^{ts}* homozygous cells. After clone induction, larvae were maintained at the permissive temperature and switched to 33°C for 8 hours before dissection to block endocytosis. Clones were identified by the absence of the marker GFP (red) and are outlined with a dashed line. Neutral lipids were imaged by Nile red staining (green), also shown in a separate panel. No changes in the pattern of lipid accumulation can be detected. Scale bars: 10 μ m (A-F) and 100 μ m in D.

S3 Fig. LTP distribution in larval tissues. (A-E) Tissues from wild type (first column) and *Df(3R)lpr1/2* homozygous larvae (second column) were dissected and LTP distribution analyzed (green). LTP accumulates in the fat body (A), oenocytes (B), salivary gland imaginal rings, indicated by an arrow in (C) and shown at higher magnification in the inset, gastric caeca (D) and ring gland (E). Nuclei were labeled with DAPI (blue, A-E) and F-actin with phalloidin (red, C-E). In the lipophorin receptors deficiency, LTP accumulates at slightly reduced levels in the tissues examined except for the salivary gland imaginal rings, for which no difference can be observed. Scale bars: 50 μ m.

S4 Fig. Characterization of the novel allele *apoLTP[excDG06206]*. (A) Genomic map of *apoLTP* gene, with exons shown as rectangles. Coding sequences are in black and the UTR in grey. The position of the transposable element *P{wHy}DG06206* is indicated, as well as the region deleted after its mobilization (grey bar), which generated the allele *apoLTP[excDG06206]*. (B-C) Animals mutant for the null allele *apoLTP[excDG06206]* show delayed growth. (B) Staged larvae of 24–48 hours after egg laying (first instar), 48–72 hours (second instar), 72–96 hours (third instar) and 96–120 hours (white pupae) are shown. Homozygous *apoLTP[excDG06206]* larvae of the same age are displayed in (C). Growth is delayed and mutant larvae do not molt, remaining in the first instar and dying after about 10 days. The gut of wild type and *apoLTP[excDG06206]* first instar larvae are also shown to illustrate a strong accumulation of neutral lipids (yellow) in a region of the midgut (bracket) in mutant animals, as revealed by Nile red staining. Nuclei are labeled with DAPI in blue. gc: gastric caeca, mt: Malpighian tubules, fb: fat body.

S5 Fig. *Cg-gal4* expression pattern. *UAS-GFP* expression driven by *Cg-gal4* in one week old females (A, B and D) and in a third instar larva (C) is shown. GFP fluorescents (green) was imaged in live animals (A-C) and fixed tissue (D). GFP was detected in larval and adult fat body. Arrows indicate the head fat body (B) and larval fat body (C). (D) Part of an adult

abdomen (bracket in A) was dissected to reveal the fat body associated to the body wall. Nuclei were labeled with DAPI (blue) and F-actin with phalloidin (red). GFP (green) is only expressed in fat body cells. Scale bar: 200 μ m.

(TIF)

S6 Fig. LTP is required for neutral lipids accumulation in imaginal discs. Wing imaginal discs displaying neutral lipids in red, revealed by oil red O staining. (A) Wild type. (B) *apoLTP* was silenced in the fat body by the expression of a *UAS-apoLTPi* transgene driven by *Cg-gal4* for 4 days. Since *apoLTP* silencing delays larval growth, to compare animals of equivalent developmental stages we selected white pupae, an easily recognizable stage that lasts for about one hour. Scale bar: 100 μ m.

(TIF)

S7 Fig. Lpr2E protein domains involved in LTP binding. (A) Alignment of the N-terminal region of six lipophorin receptor proteins from *D. melanogaster*, *D. virilis*, *Musca domestica* and *Ceratitis capitata* dipteran species. Signal peptides are not included in the alignment. The LA-1 domain, highlighted by a green bar, is highly conserved. It contains six cysteines, marked with asterisks, which form characteristic disulphide bonds. Conservation extends for 16 additional amino acids N-terminally, a region we named extension domain (ED, red bar). (B) Scheme of the modular composition of isoforms Lpr2E, Lpr2F and chimeric receptors obtained by domain swapping and used throughout this work.

(TIF)

S8 Fig. Wing imaginal discs overexpressing *UAS-lpr1H*, *UAS-lpr1J* or *UAS-lpr1M* isoforms in the posterior compartment as indicated, driven by *hh-gal4*. Larvae were hemizygous for a *shibire^{ts}* allele and endocytosis was blocked for 3 hours prior dissection and fixation. LTP only binds *lpr1* isoforms containing an extended LA-1 domain (Lpr1H and Lpr1J).

(TIF)

S9 Fig. (A-F) Larval fat body of wild type (wt, A and B), *Cg-gal4, tub-gal80^{ts}/UAS-Lpr2E* (C and D) and *Cg-gal4, tub-gal80^{ts}/UAS-Lpr2E; hh-gal4/UAS-apoLTPi* (E and F) genotypes. Larva were grown at 18°C and transferred to 29°C for two days prior to dissection to activate the UAS transgenes. LTP and lipophorin distribution are shown in red, as indicated. Nuclei are labeled with DAPI in blue and overexpressed Lpr2E-HA is shown in green, as indicated. LTP accumulates in the fat body cell membranes in the wild type (A). This accumulation is strongly potentiated by the expression of *UAS-Lpr2E* (C) and is undetectable when a *UAS-apoLTPi* transgene is co-expressed together with *UAS-Lpr2E* (E). Lipophorin can be detected in the plasma membrane and in the cytoplasm of wild type fat body cells (B). Expression of *UAS-Lpr2E* increases lipophorin accumulation in the plasma membrane (D). However, when *UAS-apoLTPi* is co-expressed together with *UAS-Lpr2E*, levels of lipophorin in the plasma membrane are similar to the wild type (F), indicating that the increased accumulation of lipophorin induced by Lpr2E requires LTP. (G-H) Imaginal discs of the indicated genotypes shown as controls for Fig 5. *UAS-lpr2E* and *UAS-apoLTPi* were expressed in the posterior compartment driven by *hh-gal4* for two days. LTP accumulates in the posterior compartment (G). However, additional expression of *UAS-LTPi* in the fat body driven by *Cg-gal4* abolishes LTP accumulation in imaginal discs (H). Note that *UAS-Lpr2E* is also expressed in the fat body in this genetic combination. Scale bar: 100 μ m.

(TIF)

Acknowledgments

We thank H. Krämer, the Bloomington *Drosophila* Stock Center and the Vienna *Drosophila* Resource Center for flies; S. Eaton, K. Kutty and the DSHB for antibodies; J. Castelli-Gair Hombria, S. Sotillos and members of their labs for suggestions; R. Barrio for critically reading the manuscript, the CABD proteomics facility for help in the affinity purification experiments and the "*Drosophila* Microinjection Facility" from the "Consolider-Ingenio 2010 GESHAPE" for microinjections.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JC MRV. Performed the experiments: MRV DV EPP JEM JC. Analyzed the data: MRV DV EPP JC. Wrote the paper: JC.

References

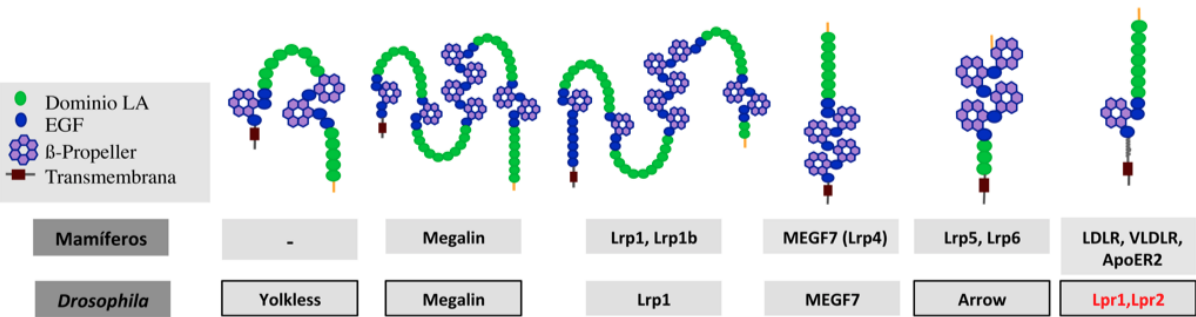
1. Arrese EL, Canavoso LE, Jouni ZE, Pennington JE, Tsuchida K, et al. (2001) Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 7–17. PMID: [11102830](#)
2. Ziegler R, Van Antwerpen R (2006) Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 264–272. PMID: [16551540](#)
3. Kuhnlein RP (2011) The contribution of the *Drosophila* model to lipid droplet research. *Prog Lipid Res* 50: 348–356. doi: [10.1016/j.plipres.2011.04.001](#) PMID: [21620889](#)
4. Palm W, Sampaio JL, Brankatschk M, Carvalho M, Mahmoud A, et al. (2012) Lipoproteins in *Drosophila melanogaster*—assembly, function, and influence on tissue lipid composition. *PLoS Genet* 8: e1002828. doi: [10.1371/journal.pgen.1002828](#) PMID: [22844248](#)
5. Kutty RK, Kutty G, Kambadur R, Duncan T, Koonin EV, et al. (1996) Molecular characterization and developmental expression of a retinoid- and fatty acid-binding glycoprotein from *Drosophila*. A putative lipophorin. *J Biol Chem* 271: 20641–20649. PMID: [8702812](#)
6. Van der Horst DJ (1990) Lipid transport function of lipoproteins in flying insects. *Biochim Biophys Acta* 1047: 195–211. PMID: [2252909](#)
7. van der Horst DJ, van Hoof D, van Marrewijk WJ, Rodenburg KW (2002) Alternative lipid mobilization: the insect shuttle system. *Mol Cell Biochem* 239: 113–119. PMID: [12479576](#)
8. Tsuchida K, Wells MA (1990) Isolation and characterization of a lipoprotein receptor from the fat body of an insect, *Manduca sexta*. *J Biol Chem* 265: 5761–5767. PMID: [2156827](#)
9. Gondim KC, Wells MA (2000) Characterization of lipophorin binding to the midgut of larval *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 405–413. PMID: [10745164](#)
10. Dantuma NP, Van Marrewijk WJ, Wynne HJ, Van der Horst DJ (1996) Interaction of an insect lipoprotein with its binding site at the fat body. *J Lipid Res* 37: 1345–1355. PMID: [8808769](#)
11. Fruttero LL, Demartini DR, Rubiolo ER, Carlini CR, Canavoso LE (2014) beta-chain of ATP synthase as a lipophorin binding protein and its role in lipid transfer in the midgut of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem Mol Biol* 52: 1–12. doi: [10.1016/j.ibmb.2014.06.002](#) PMID: [24952172](#)
12. Dantuma NP, Potters M, De Winther MP, Tensen CP, Kooiman FP, et al. (1999) An insect homolog of the vertebrate very low density lipoprotein receptor mediates endocytosis of lipophorins. *J Lipid Res* 40: 973–978. PMID: [10224168](#)
13. Parra-Peralbo E, Culi J (2011) *Drosophila* lipophorin receptors mediate the uptake of neutral lipids in oocytes and imaginal disc cells by an endocytosis-independent mechanism. *PLoS Genet* 7: e1001297. doi: [10.1371/journal.pgen.1001297](#) PMID: [21347279](#)
14. Parvy JP, Napal L, Rubin T, Poidevin M, Perrin L, et al. (2012) *Drosophila melanogaster* Acetyl-CoA-carboxylase sustains a fatty acid-dependent remote signal to waterproof the respiratory system. *PLoS Genet* 8: e1002925. doi: [10.1371/journal.pgen.1002925](#) PMID: [22956916](#)
15. Blacklock BJ, Ryan RO (1994) Hemolymph lipid transport. *Insect Biochem Mol Biol* 24: 855–873. PMID: [7951265](#)
16. Canavoso LE, Wells MA (2001) Role of lipid transfer particle in delivery of diacylglycerol from midgut to lipophorin in larval *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 783–790. PMID: [11378413](#)
17. Yun HK, Jouni ZE, Wells MA (2002) Characterization of cholesterol transport from midgut to fat body in *Manduca sexta* larvae. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1151–1158. PMID: [12213250](#)

18. Jouni ZE, Takada N, Gizard J, Maekawa H, Wells MA, et al. (2003) Transfer of cholesterol and diacylglycerol from lipophorin to *Bombyx mori* ovarioles in vitro: role of the lipid transfer particle. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 145–153. PMID: [12535673](#)
19. Canavoso LE, Yun HK, Jouni ZE, Wells MA (2004) Lipid transfer particle mediates the delivery of diacylglycerol from lipophorin to fat body in larval *Manduca sexta*. *J Lipid Res* 45: 456–465. PMID: [14679163](#)
20. Yokoyama H, Yokoyama T, Yuasa M, Fujimoto H, Sakudoh T, et al. (2013) Lipid transfer particle from the silkworm, *Bombyx mori*, is a novel member of the apoB/large lipid transfer protein family. *J Lipid Res* 54: 2379–2390. doi: [10.1194/jlr.M037093](#) PMID: [23812557](#)
21. Panakova D, Sprong H, Marois E, Thiele C, Eaton S (2005) Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* 435: 58–65. PMID: [15875013](#)
22. Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, et al. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24: 218–229. PMID: [11403571](#)
23. Callejo A, Culi J, Guerrero I (2008) Patched, the receptor of Hedgehog, is a lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 912–917. doi: [10.1073/pnas.0705603105](#) PMID: [18198278](#)
24. McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K, Davis RL (2003) Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302: 1765–1768. PMID: [14657498](#)
25. Rusten TE, Lindmo K, Juhasz G, Sass M, Seglen PO, et al. (2004) Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev Cell* 7: 179–192. PMID: [15296715](#)
26. Capdevila J, Pariente F, Sampedro J, Alonso JL, Guerrero I (1994) Subcellular localization of the segment polarity protein patched suggests an interaction with the wingless reception complex in *Drosophila* embryos. *Development* 120: 987–998. PMID: [7600973](#)
27. Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34–47. PMID: [3513311](#)
28. Chino H, Kitazawa K (1981) Diacylglycerol-carrying lipoprotein of hemolymph of the locust and some insects. *J Lipid Res* 22: 1042–1052. PMID: [6795289](#)
29. Canavoso LE, Jouni ZE, Karnas KJ, Pennington JE, Wells MA (2001) Fat metabolism in insects. *Annu Rev Nutr* 21: 23–46. PMID: [11375428](#)
30. Dallinga-Thie GM, Franssen R, Mooij HL, Visser ME, Hassing HC, et al. (2010) The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis* 211: 1–8. doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2009.12.027](#) PMID: [20117784](#)
31. Eugster C, Panakova D, Mahmoud A, Eaton S (2007) Lipoprotein-heparan sulfate interactions in the Hh pathway. *Dev Cell* 13: 57–71. PMID: [17609110](#)
32. Blacklock BJ, Smillie M, Ryan RO (1992) Insect lipid transfer particle can facilitate net vectorial lipid transfer via a carrier-mediated mechanism. *J Biol Chem* 267: 14033–14037. PMID: [1629202](#)
33. Ryan RO, Howe A, Scraba DG (1990) Studies of the morphology and structure of the plasma lipid transfer particle from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J Lipid Res* 31: 871–879. PMID: [2380635](#)
34. Dantuma NP, Pijnenburg MA, Diederer JH, Van der Horst DJ (1998) Multiple interactions between insect lipoproteins and fat body cells: extracellular trapping and endocytic trafficking. *J Lipid Res* 39: 1877–1888. PMID: [9741701](#)
35. Dantuma NP, Pijnenburg MA, Diederer JH, Van der Horst DJ (1997) Developmental down-regulation of receptor-mediated endocytosis of an insect lipoprotein. *J Lipid Res* 38: 254–265. PMID: [9162745](#)
36. Van Hoof D, Rodenburg KW, Van der Horst DJ (2002) Insect lipoprotein follows a transferrin-like recycling pathway that is mediated by the insect LDL receptor homologue. *J Cell Sci* 115: 4001–4012. PMID: [12356906](#)
37. Van Hoof D, Rodenburg KW, Van der Horst DJ (2005) Receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking of lipoproteins and transferrin in insect cells. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 117–128. PMID: [15681222](#)
38. Khaliullina H, Panáková D, Eugster C, Riedel F, Carvalho M, et al. (2009) Patched regulates Smoothed trafficking using lipoprotein-derived lipids. *Development* 136: 4111–4121. doi: [10.1242/dev.041392](#) PMID: [19906846](#)
39. Buchon N, Osman D, David FP, Fang HY, Boquete JP, et al. (2013) Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Rep* 3: 1725–1738.
40. Singh TK, Scraba DG, Ryan RO (1992) Conversion of human low density lipoprotein into a very low density lipoprotein-like particle in vitro. *J Biol Chem* 267: 9275–9280. PMID: [1343558](#)

41. Sakudoh T, Kuwazaki S, Iizuka T, Narukawa J, Yamamoto K, et al. (2013) CD36 homolog divergence is responsible for the selectivity of carotenoid species migration to the silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *J Lipid Res* 54: 482–495. doi: [10.1194/jlr.M032771](https://doi.org/10.1194/jlr.M032771) PMID: [23160179](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23160179/)
42. Grigliatti TA, Hall L, Rosenbluth R, Suzuki DT (1973) Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. XIV. A selection of immobile adults. *Mol Gen Genet* 120: 107–114. PMID: [4631264](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4631264/)
43. Wucherpfennig T, Wilsch-Brauninger M, Gonzalez-Gaitan M (2003) Role of *Drosophila* Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked neurotransmitter release. *J Cell Biol* 161: 609–624. PMID: [12743108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12743108/)
44. Pulipparacharuvil S, Akbar MA, Ray S, Sevrioukov EA, Haberman AS, et al. (2005) *Drosophila* Vps16A is required for trafficking to lysosomes and biogenesis of pigment granules. *J Cell Sci* 118: 3663–3673. PMID: [16046475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16046475/)
45. Tanimoto H, Itoh S, ten Dijke P, Tabata T (2000) Hedgehog creates a gradient of DPP activity in *Drosophila* wing imaginal discs. *Mol Cell* 5: 59–71. PMID: [10678169](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10678169/)
46. Gronke S, Beller M, Fellert S, Ramakrishnan H, Jackle H, et al. (2003) Control of fat storage by a *Drosophila* PAT domain protein. *Curr Biol* 13: 603–606. PMID: [12676093](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12676093/)
47. Huet F, Lu JT, Myrick KV, Baugh LR, Crosby MA, et al. (2002) A deletion-generator compound element allows deletion saturation analysis for genome-wide phenotypic annotation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9948–9953. PMID: [12096187](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12096187/)
48. Kyriakakis P, Tipping M, Abed L, Veraksa A (2008) Tandem affinity purification in *Drosophila*: the advantages of the GS-TAP system. *Fly (Austin)* 2: 229–235.
49. Rorth P (1998) Gal4 in the *Drosophila* female germline. *Mech Dev* 78: 113–118. PMID: [9858703](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9858703/)
50. Bischof J, Maeda RK, Hediger M, Karch F, Basler K (2007) An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3312–3317. PMID: [17360644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17360644/)
51. Rupp RA, Snider L, Weintraub H (1994) *Xenopus* embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes Dev* 8: 1311–1323. PMID: [7926732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7926732/)
52. Venken KJ, Carlson JW, Schulze KL, Pan H, He Y, et al. (2009) Versatile P[acman] BAC libraries for transgenesis studies in *Drosophila melanogaster*. *Nat Methods* 6: 431–434. doi: [10.1038/nmeth.1331](https://doi.org/10.1038/nmeth.1331) PMID: [19465919](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19465919/)
53. Warming S, Costantino N, Court DL, Jenkins NA, Copeland NG (2005) Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res* 33: e36. PMID: [15731329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15731329/)
54. Oeffinger M, Wei KE, Rogers R, DeGrasse JA, Chait BT, et al. (2007) Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. *Nat Methods* 4: 951–956. PMID: [17922018](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17922018/)
55. Potter CJ, Tasic B, Russler EV, Liang L, Luo L (2010) The Q system: a repressible binary system for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis. *Cell* 141: 536–548. doi: [10.1016/j.cell.2010.02.025](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.025) PMID: [20434990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20434990/)
56. Tennessen JM, Barry WE, Cox J, Thummel CS (2014) Methods for studying metabolism in *Drosophila*. *Methods* 68: 105–115. doi: [10.1016/j.ymeth.2014.02.034](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.02.034) PMID: [24631891](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24631891/)

1. Estudio de los péptidos señal en la familia LDLR

En primer lugar, quisimos analizar los péptidos señal de la familia de los receptores LDL tanto de mamíferos como de *Drosophila*. Hemos agrupado los receptores dependiendo de su homología estructural, es decir, del número y la disposición de sus distintos dominios. Los receptores remarcados en negro presentan, según la predicción de PrediSi, péptidos señal largos.



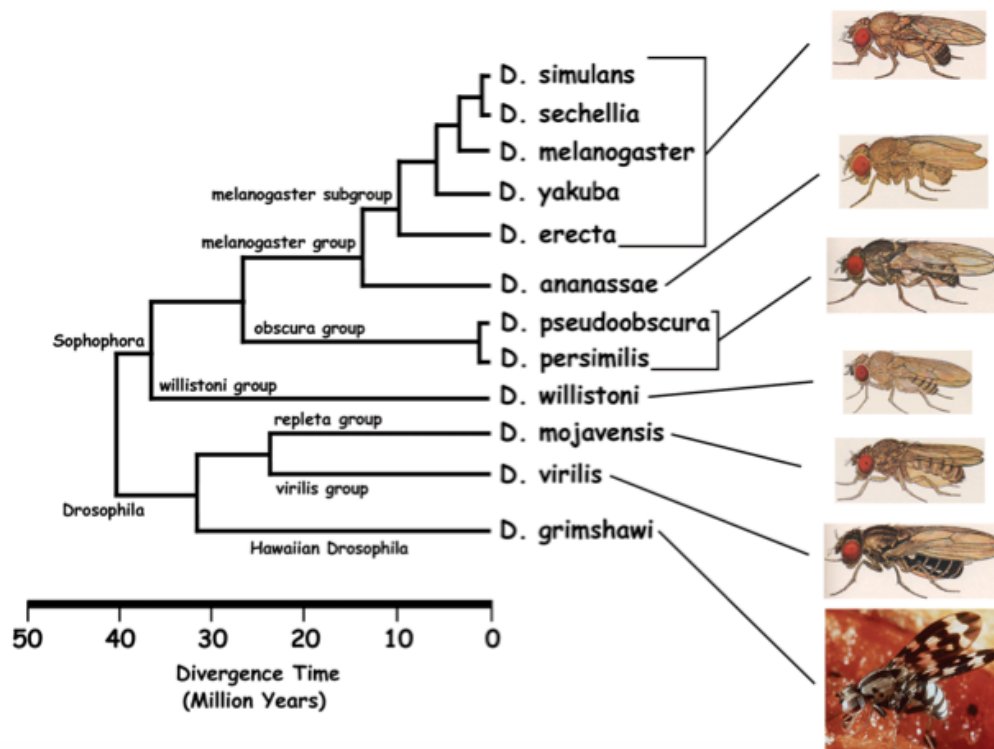
En la siguiente tabla se especifica la longitud de cada uno de ellos, enfatizando los de mayor longitud en negrita. De este análisis podemos concluir que la mayor parte de las proteínas pertenecientes a la familia LDLR de *Drosophila* presentan péptidos señal atípicamente largos, característica no compartida por los receptores de mamíferos.

MAMÍFEROS			<i>Drosophila melanogaster</i>		
Proteína	SP (aa)	Gen Uniprot	Proteína	SP (aa)	Gen Uniprot
			Yolkless	80	P98163
Megalin	25	P98164	Megalin	42	A8JTM7
LRP1, LRP1b	20	Q07954	LRP1	21	A1Z7C4
MEGF7 (LRP4)	20	O75096	MEGF7	22	B5X533
LRP5,LRP6	31, 19	O75197/ O75581	Arrow	61	Q95V09
LDLR	24	P01130	Lpr1	68, 20	Q9VBN0/ A8JRD1
VLDLR	23	P98155	Lpr2	88, 24	Q7YU01/ Q7YTZ6
ApoER2	32	Q14114			

SP: del inglés *Signal Peptide*, aa: aminoácido(s)

2. Análisis en otras especies de dípteros

Seguidamente, realizamos una búsqueda mediante BLAST de proteínas homólogas a los receptores de lipoforinas en especies relacionadas de dípteros, destacando los del mismo género de *Drosophila* (ver árbol filogenético obtenido de insects.eugenes.org).



De esta manera, examinamos tanto la longitud como el sitio de corte predicho. Al examinar las isoformas con **péptidos señal largos**, observamos que a pesar de que la longitud fuese variable, la secuencia del sitio de corte se conservaba tanto en *lpr1* como en *lpr2*. Hay que destacar que en ambas proteínas de la especie *Drosophila willistoni* los sitios de corte eran ligeramente distintos al resto. Cuando examinamos los receptores de lipoforinas de otros organismos modelo, sólo obtuvimos péptidos señales atípicos en *Musca domestica*, *Ceratitis capitata*, y *Bactrocera dorsalis*, en estas dos últimas su sitio de corte eran idénticos, además, muy similares al del gen *lpr1*.

Receptores de lipoforinas 1 (*lpr1*)

Especie	SP (aa)	Score	Sitio de corte	Gen Uniprot
<i>D. simulans</i>	68	0,9414	TA TP	B4QVE0
<i>D. sechellia</i>	68	0,9414	TA TP	B4ICD2
<i>D. melanogaster</i>	68	0,9400	TA TP	Q9VBN0
<i>D. yakuba</i>	69	0,9414	TA TP	B4PTH0
<i>D. erecta</i>	72	0,9414	TA TP	B3P6F8
<i>D. ananassae</i>	79	0,9400	TA TP	B3LYM0
<i>D. pseudoobscura</i>	75	0,9708	TA TP	B5DYP7
<i>D. persimilis</i>	75	0,9708	TA TP	B4GFZ1
<i>D. willistoni</i>	73	0,9913	SA TP	B4NJC5
<i>D. mojavensis</i>	71	0,8758	TA TP	B4K4U9
<i>D. virilis</i>	80	0,8532	TA TP	B4M4P2
<i>D. grimshawi</i>	88	0,9668	TA TP	B4JT36
Consenso	73,8	0,9395	TA TP	

Receptores de lipoforinas 2 (*lpr2*)

Especie	SP (aa)	Score	Sitio de corte	Gen Uniprot
<i>D. simulans</i>	83	0,6671	NA AA	B4QVD8
<i>D. sechellia</i>	90	0,6671	NA AA	B4ICD0
<i>D. melanogaster</i>	88	0,6671	NA AA	Q7YU01
<i>D. yakuba</i>	77	0,6671	NA AA	B4PTH2
<i>D. erecta</i>	89	0,5981	NA AA	B3P6F9
<i>D. ananassae</i>	82	0,4736	NA AA	B3LYM1
<i>D. pseudoobscura</i>	94	0,5343	NA AA	Q295M5
<i>D. persimilis</i>	94	0,5343	NA AA	B4GFZ2
<i>D. willistoni</i>	-	-	-- AA	B4NJC7
<i>D. mojavensis</i>	82	0,5200	NA AA	B4K4V0
<i>D. virilis</i>	79	0,5898	NA AA	B4M4P1
<i>D. grimshawi</i>	85	-	NA AA	B4JT37
Consenso	86,0	0,5835	NA AA	

OTRAS ESPECIES



Especie	SP (aa)	Score	Sitio de corte	Gen Uniprot
<i>Ceratitidis capitata</i>	62	0,6121	TA GP	W8B062
<i>Musca domestica</i>	97	0,5747	AA AD	T1PEP9
<i>Aedes aegypti</i>	22	0,772	DA SK	Q963T3
<i>Bombyx mori</i> *	34	0,5439	FG AA	Q2PGW1
<i>Blattella germanica</i> *	17	0,6721	SS CS	A3KL83
<i>Bactrocera dorsalis</i>	62	0,6121	TA GP	A0A034VFQ6

*En Gopalapillai *et al.*, 2006 y Ciudad *et al.*, 2007 los péptidos señales predichos son de 37 y 22 aminoácidos respectivamente. Las imágenes fueron tomadas (de izquierda a derecha) de ambiente.gob.ec, wikimedia, nbcnews.com, naturenorth.cm, acercaciencia.com y flickr.com.

Del mismo modo, analizamos aquellas isoformas con **péptidos señal cortos** de ambos genes. En este caso, aunque todos tuvieran aproximadamente la misma longitud, discernían en cuanto a la secuencia del sitio de corte. Si observamos con más detenimiento, podemos apreciar como en ambos casos hay dos grupos de secuencias que concuerdan con los del árbol filogenético mostrado previamente (subgrupo *melanogaster* junto con *D. pseudoobscura* y el resto), resaltado en negrita.

Receptores de lipoforinas 1 (*lpr1*)

Especie	SP (aa)	Score	Sitio de corte	Gen Uniprot
<i>D. simulans</i>	20	0,7165	QS FR	B4QVD9
<i>D. sechellia</i>	20	0,7165	QS FR	B4ICD1
<i>D. melanogaster</i>	20	0,7165	QS FR	A8JRD1
<i>D. yakuba</i>	20	0,7025	QS FR	B4PTH1
<i>D. erecta</i>	20	0,7025	QS FR	GG12223-PE**
<i>D. ananassae</i>	16	0,6283	HS QG	A0A0P8XZK3
<i>D. pseudoobscura</i>	20	0,6892	QS FR	I5APG8
<i>D. persimilis</i>	20	0,6892	HS FG	GL22297**
<i>D. willistoni</i>	21	0,7064	HS FG	A0A0Q9X7Q1
<i>D. mojavensis</i>	16	0,6645	HT QS	A0A0Q9X1I1
<i>D. virilis</i>	16	0,5611	HT QS	A0A0Q9W1J8
<i>D. grimshawi</i>	20	0,6709	HS LG	GH23433**
Consenso	19,1	0,6803	Q/HS F/QR	

Receptores de lipoforinas 2 (*lpr2*)

Especie	SP (aa)	Score	Sitio de corte	Gen Uniprot
<i>D. simulans</i>	20	0,6097	HA SR	B4QVD7
<i>D. sechellia</i>	24	0,5952	HA SR	GM10225**
<i>D. melanogaster</i>	24	0,6097	HA SR	Q7YTZ6
<i>D. yakuba</i>	26	0,5902	SR FE/HA SR	A0A0R1E5F4
<i>D. erecta</i>	24	0,5709	HA SR	GG12224**
<i>D. ananassae</i>	26	0,7391	HT IT	A0A0P8YF16
<i>D. pseudoobscura</i>	27	0,8181	HL QP	I5APH1
<i>D. persimilis</i>	27	0,8181	HL QP	GL22298**
Consenso	24,8	0,6689	Hx xR	

** Gen ID

